

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日

2003年12月18日 (18.12.2003)

PCT

(10)国際公開番号

WO 03/104453 A1

(51)国際特許分類:
C12N 15/09, 5/16,
C07K 16/08, A01K 67/027

駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka
(JP).

(21)国際出願番号:

PCT/JP03/07071

(74)代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU,Hatsushi et al.); 〒
300-0847 茨城県 土浦市 阿町 1-1-1 関鉄つくばビ
ル 6階 Ibaraki (JP).

(22)国際出願日:

2003年6月4日 (04.06.2003)

(25)国際出願の言語:

日本語

(26)国際公開の言語:

日本語

(30)優先権データ:

特願2002-164834 2002年6月5日 (05.06.2002) JP
特願2002-180351 2002年6月20日 (20.06.2002) JP

(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 中
外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI
KAISHA) [JP/IP]; 〒115-8543 東京都 北区 浮間5丁
目5番1号 Tokyo (JP).

(72)発明者; および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 児玉 龍彦 (KO-
DAMA,Tatsuhiro) [JP/JP]; 〒154-0002 東京都 世田谷
区 下馬4丁目16番5号 Tokyo (JP). 寺社下 浩一
(JISHAGE,Kou-ichi) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県 御殿
場市 駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内
Shizuoka (JP). 鎌田 宣夫 (KAMADA,Nobuo) [JP/JP]; 〒
412-8513 静岡県 御殿場市 駒門1丁目135番地
中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 山田 良樹 (YA-
MADA,Yoshiki) [JP/JP]; 〒412-8513 静岡県 御殿場市

(84)指定国(広域): ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイドスノート」を参照。

A1

(54)Title: METHOD OF CONSTRUCTING ANTIBODY

(54)発明の名称: 抗体作製方法

(57)Abstract: A method of producing an antibody which involves the step of administering an immunogen containing a target antigen and a background antigen to a transgenic animal having a gene encoding the background antigen transferred thereto. Because of being immunotolerant to the background antigen, the transgenic animal effectively produces an antibody against the target antigen.

WO 03/104453

(57)要約: 標的抗原と背景抗原を含む免疫原を、背景抗原をコードする遺伝子を導入したトランスジェニック動物に投与する工程を含む、抗体の製造方法が提供された。トランスジェニック動物は背景抗原に対して免疫対応の状態にあるので、標的抗原に対する抗体を効率的に产生する。

- 1 -

明細書

抗体作製方法

技術分野

本発明は、抗体の作製方法に関する。また本発明は、本発明の抗体作製方法により得られた抗体に関する。さらに本発明は、本発明の抗体作製に有用な、トランジジェニック非ヒト動物に関する。

背景技術

抗体は様々な疾患の治療薬、診断薬、あるいは試薬などとして有用である。現在までに多くの抗体が取得されてきた。抗体を作製するための一般的な方法としては、抗原をマウスなどの哺乳動物に投与して、該動物の血清から抗体を取得する方法が用いられている。抗体の作製において、たとえば次のような場合には、目的とする抗体を効率的に得られないことがある。

- ・ 哺乳動物に免疫する抗原の量が少い
- ・ 抗原が十分に精製されていない

したがって、免疫に当たっては、十分に精製された多量の抗原を用意することが望ましい。しかし現実には、抗原の中には精製が困難なものや、十分な量を用意することが困難なものも多い。つまり抗原の調製工程が、しばしば抗体作製における障害となっていた。

免疫原の調製が困難な抗原の一つとして、膜蛋白質を示すことができる。一般に、膜蛋白質を大量に発現させることや十分に精製することは困難な場合が多い。このことが膜蛋白質に対する抗体の取得における障害となっていた。

膜蛋白質を大量に発現させる方法として、バキュロウイルスを利用する方法が注目されている。目的の膜蛋白質をコードする遺伝子をバキュロウイルスゲノム

- 2 -

に導入することによって、出芽バキュロウイルスの膜上に目的の膜蛋白質が発現される（W098/46777、特開2001-333773）。これらの方法を用いるとバキュロウイルスの膜上に目的とする膜蛋白質を大量に発現させることができる。

ところが、こうして得られるバキュロウイルスの膜上には、外来性の膜蛋白質以外にもバキュロウイルス由来の膜蛋白質が発現している。そのため、出芽バキュロウイルスを免疫原として抗体を作製した場合には、バキュロウイルス由来の膜蛋白質に対する抗体も産生される。その結果、公知の免疫方法によって効率よく目的の膜蛋白質に対する抗体を作製することは困難であった。

たとえば、出芽バキュロウイルスによる免疫は、しばしばgp64を認識する抗体を誘導する。gp64は、バキュロウイルスの膜蛋白質に大量に含まれている。加えて、gp64は、抗原性が高いため免疫動物において非自己と認識されやすい。結果的に、出芽バキュロウイルスは、抗gp64抗体を優先的に誘導すると考えられる。

したがって、バキュロウイルス膜上に発現した目的の膜蛋白質を抗原として使用するためには、該膜蛋白質を十分に精製する必要がある。ところが、一般に出芽バキュロウイルスから外来性の膜蛋白質を精製することは難しい。したがって、免疫に十分な量の、高度に精製された膜蛋白質を得ることは、現実にはできないといってよい。このような精製が困難な抗原については、通常の方法によって目的とする抗体を得ることは困難であった。

発明の開示

本発明は上記の問題点を解決することを目的とする。すなわち本発明は、目的とする抗体を容易に得ることができる抗体の製造方法の提供を課題とする。また本発明は、目的とする抗体を効率良く産生するトランスジェニック非ヒト動物の提供を課題とする。

本発明者らは上記課題を解決するために、免疫原に含まれる目的とする抗体の取得を妨げる抗原の存在に着目した。そして、この種の抗原に対する免疫応答を

- 3 -

抑制した免疫動物を用いることによって、目的とする抗体を容易に得ることができると考えた。更に、目的とする抗体の取得を妨げる抗原に対する免疫寛容を利用して免疫動物の免疫応答を調節すれば、上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、以下の抗体作製方法、該方法に有用なトランスジェニック非ヒト動物、並びに該非ヒト動物の製造方法に関する。

- [1] 免疫原に含まれている背景抗原に対して免疫寛容を有する非ヒト動物を、標的抗原と背景抗原を含む免疫原で免疫し、標的抗原に対する抗体または抗体をコードする遺伝子を取得する工程を含む標的抗原を認識する抗体の作製方法。
- [2] 免疫寛容を人為的に誘導することを特徴とする〔1〕に記載の方法。
- [3] 非ヒト動物がトランスジェニック非ヒト動物である〔1〕に記載の方法。
- [4] 以下の工程を含む、標的抗原に対する抗体の作製方法。
 - (a) 標的抗原と背景抗原を含む免疫原を調製する工程、
 - (b) 背景抗原をコードする遺伝子を発現可能に保持したトランスジェニック非ヒト動物を作製する工程、
 - (c) (a) の免疫原を (b) のトランスジェニック非ヒト動物に投与する工程、および
 - (d) トランスジェニック非ヒト動物から標的抗原に対する抗体を採取する工程
- [5] 免疫原がウイルス粒子、またはその一部である〔4〕に記載の方法。
- [6] ウィルスがバキュロウイルスである〔5〕に記載の方法。
- [7] 標的抗原が膜蛋白質である〔4〕に記載の方法。
- [8] 背景抗原がgp64である〔6〕に記載の方法。
- [9] 非ヒト動物がマウスである〔4〕に記載の方法。
- [10] [1] ~ [9] のいずれかに記載の方法により作製された抗体。
- [11] [10] に記載の抗体を元にして作製した非ヒト動物一ヒトキメラ抗体、

- 4 -

またはヒト型化抗体。

[12] ウィルス由来膜蛋白質をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニック非ヒト動物。

[13] ウィルスがバキュロウイルスである [12] に記載のトランスジェニック非ヒト動物。

[14] ウィルス由来膜蛋白質がgp64である [13] に記載の非ヒト動物。

[15] 非ヒト動物がマウスである [12] に記載の非ヒト動物。

[16] ウィルス由来蛋白質を含む抗原に対する抗体製造用である [12] に記載の非ヒト動物。

[17] 背景抗原をコードする遺伝子を導入したトランスジェニック非ヒト動物を作製する工程を含む非ヒト免疫動物の製造方法。

[18] [17] に記載の方法によって製造された、背景抗原を含む標的抗原に対する抗体を得るために非ヒト免疫動物。

[19] 次の工程を含む、PepT1に対する抗体の製造方法。

a) PepT1またはその断片をコードするDNAを発現可能に保持したバキュロウイルスを調製する工程

b) a) のバキュロウイルスを宿主細胞に感染させ、PepT1またはその断片を発現した出芽ウイルスを得る工程

c) バキュロウイルスの膜蛋白質gp64をコードする遺伝子を発現可能に保持したトランスジェニック非ヒト動物を作製する工程

d) c) のトランスジェニック非ヒト動物に b) の出芽ウイルスまたはPepT1またはその断片を含む分画を免疫する工程、および

e) 免疫動物から、PepT1を認識する抗体を回収する工程

本発明は、免疫原に含まれている背景抗原に対して免疫寛容を有する非ヒト動物を、標的抗原と背景抗原を含む免疫原で免疫する工程を含む標的抗原を認識する抗体の作製方法に関する。

- 5 -

本発明において、標的抗原とは、目的とする抗体が認識する抗原を言う。標的抗原は、抗原性を有する任意の物質から選択することができる。具体的には、蛋白質、糖鎖、脂質、あるいは無機物質などが抗原性を示す物質として知られている。標的抗原は、天然に存在するものであることもできるし、人工的に合成されたものであっても良い。人工的に合成されたものには、遺伝子工学技術を利用して作製された組み換え蛋白質や、化学的に合成された様々な有機物質が含まれる。

一方、本発明において、背景抗原(back ground antigens)とは、抗体の產生を希望しない抗原決定基を有する物質、またはその抗原決定基そのものを言う。たとえば、標的抗原に混在する標的抗原以外の抗原性物質は、背景抗原である。代表的な背景抗原は、粗精製状態の標的抗原に混在する蛋白質である。より具体的には、組み換え蛋白質に含まれる宿主に由来する蛋白質を、背景抗原として示すことができる。背景抗原とは、目的とする抗体産生を誘導するための免疫原に含まれ、目的としない抗体の産生を誘導する原因となる抗原と定義することもできる。

一般に、背景抗原とは、標的抗原以外の抗原性物質である。しかし本発明においては、標的抗原と同じ分子上に存在する抗原決定基を背景抗原と言う場合もある。たとえば標的抗原と同じ分子上に抗体の產生を希望しない抗原決定基がある場合、該抗原決定基は背景抗原である。あるいは背景抗原である抗原決定基を含み、かつ標的抗原を含まない物質は、本発明における背景抗原に含まれる。

本発明における好ましい背景抗原として、蛋白質、ペプチド、糖、あるいは糖タンパク質を示すことができる。中でも、蛋白質あるいはペプチドは、本発明における特に好ましい背景抗原である。ペプチドとは、たとえば100以下のアミノ酸残基からなるポリペプチドを言う。ペプチドは蛋白質に含まれる。

本発明において免疫寛容(immunotolerance)とは、免疫寛容の対象となる抗原(寛容原; immunotolerance antigens)に対して特異的に免疫応答が失われるか、または低下することを言う。正常な免疫動物の寛容原に対する免疫応答に対して、

- 6 -

ある個体の同じ寛容原に対する免疫応答が低下しているとき、この個体は寛容原に対する免疫寛容を有すると言う。たとえば寛容原を投与した場合に産生される寛容原に対する抗体の量が減少していれば、免疫応答が低下していると見なすことができる。免疫寛容のレベルは制限されない。

なお寛容原とは、その個体の免疫応答が低下している抗原性物質を言う。また本発明において寛容原に対して特異的な免疫応答の低下とは、他の抗原に対する免疫応答と比較して、寛容原に対する免疫応答の低下のレベルが大きいことを言う。したがって、寛容原以外の抗原に対する免疫応答が低下していても、その低下のレベルが寛容原に対する免疫応答のレベルよりも小さい場合には、免疫寛容が成立している。また本発明における免疫寛容は、背景抗原以外の抗原性物質に対する免疫寛容を伴っている場合も含む。複数の抗原に対する免疫寛容を有する場合であっても、標的抗原に対する免疫応答を有する限り本発明に利用することができる。一方、免疫応答そのものが低下している免疫不全状態は、標的抗原に対する抗体の産生が期待できないので望ましくない。

本発明は、背景抗原に対して免疫寛容を有する非ヒト動物を免疫動物として利用する。本発明における免疫寛容を有する非ヒト動物は、人為的に免疫寛容を誘導されていることが好ましい。免疫寛容を有する非ヒト動物は、たとえば次のようにして作製することができる。

まず、背景抗原をコードする遺伝子を非ヒト動物に導入し、背景抗原遺伝子トランスジェニック動物を作製することができる。トランスジェニック動物は、導入された遺伝子の発現産物（背景抗原）に対して免疫寛容となる。また、胎児期ないし生後間もない非ヒト動物に寛容原（背景抗原）を複数回投与することにより、免疫寛容を誘導することもできる。

胎児期または生後間もない非ヒト動物に寛容原となる抗原を投与する方法としては、抗原となる物質そのものを非ヒト動物に投与する方法を示すことができる。その他、寛容原を間接的に投与することもできる。例えば、生体内で寛容原をコ

- 7 -

ードする遺伝子を発現させることによって、目的とする寛容原を投与することもできる。このような方法の例としては、抗原をコードするDNAを直接投与する方法(naked DNA method)や、抗原を発現する細胞を非ヒト動物に移植する方法、ウイルスベクターを用いる方法、DNAワクチンを用いる方法などを挙げることができる。

これらの方法の中でも、寛容原をコードする遺伝子を発現可能な状態で保持したトランスジェニック非ヒト動物は、本発明における免疫寛容を有する非ヒト動物として好ましい。トランスジェニック動物は、免疫機能が成熟する前に、本来は外来性の蛋白質である寛容原を生体内に有している。そのため、免疫機能は、寛容原を完全に自己と見なす可能性が非常に高い。したがって、本発明における免疫寛容を誘導する方法としては、トランスジェニック非ヒト動物を利用することは有利である。寛容原を導入したトランスジェニック動物において、寛容原に対する抗体がほとんど産生されないことは、実施例においても示したとおりである。

またトランスジェニック動物は、免疫寛容の形質を子孫に伝えることができる。したがって、本発明のためのトランスジェニック非ヒト動物が樹立されれば、同様の形質を有する免疫動物を安定して供給することができる。

本発明はまた、ウイルス由来蛋白質を含む抗原に対する抗体製造用の、ウイルス由来膜蛋白質をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニック非ヒト動物に関する。あるいは本発明は、ウイルス由来膜蛋白質をコードする遺伝子発現可能に保持したトランスジェニック非ヒト動物の、ウイルス由来蛋白質を含む抗原に対する抗体を製造するための免疫動物としての使用に関する。更に本発明は、背景抗原をコードする遺伝子を導入したトランスジェニック非ヒト動物を作製する工程を含む非ヒト免疫動物の製造方法に関する。

様々な遺伝子が導入されたトランスジェニック非ヒト動物が公知である。しかし背景抗原をコードする外来性遺伝子を導入した動物が、背景抗原を含む標的抗

原の免疫動物として有用であることは知られていない。

標的抗原蛋白を欠失させた遺伝子欠損動物（いわゆるノックアウト動物）は、標的抗原を先天的に保有していないため、この遺伝子欠損動物に、標的抗原を投与することにより、抗原と投与される動物のそれとの相同性の高い蛋白であっても、標的抗原に対する抗体を得ることができる。この標的抗原欠損動物と当該トランスジェニック動物との交配で標的抗原蛋白欠損・寛容原発現動物も作出可能である。

また、胎児期あるいは生後間もない非ヒト動物に、naked DNA法やDNAワクチン、あるいは背景抗原を発現している細胞を移植する方法などにより胎児期以降に遺伝子を導入することも可能である。上記のように作製された非ヒト動物も本発明のトランスジェニック非ヒト動物に含まれる。

本発明に用いる免疫寛容を有する非ヒト動物において、免疫寛容を誘導するための背景抗原の数は限定されない。すなわち、少なくとも1つの背景抗原に対して、免疫寛容が誘導された非ヒト動物を本発明の抗体作製方法に利用することができる。あるいは複数種の背景抗原に対して免疫寛容が誘導された非ヒト動物を免疫動物とすることもできる。

免疫動物において、免疫原に含まれる可能性のある、全ての背景抗原に対して、抗体の產生が抑制されることは必ずしも重要ではない。標的抗原に対する抗体の產生と取得が妨げられない範囲であれば、背景抗原を認識する抗体の產生は許容される。したがって、たとえば、主要な背景抗原に対してのみ免疫寛容が誘導された免疫動物であっても、本発明の好ましい免疫動物として利用することができる。

本発明において、非ヒト動物としては、例えば、サル、ブタ、イヌ、ラット、マウス、ウサギ、などを挙げることができる。たとえば、ラット、マウス、ハムスターなどのげっ歯類は、好ましい非ヒト動物である。トランスジェニック動物とすることで免疫寛容を誘導するには、げっ歯類のような、成熟が早く、遺伝子

- 9 -

操作の手法が確立されている非ヒト動物が有利である。特にマウスは、これらの条件を高い水準で満たすことができる非ヒト動物である。

本発明は、ウイルス由来の膜蛋白質をコードする遺伝子を導入したトランスジェニック非ヒト動物に関する。本発明のトランスジェニック非ヒト動物は、ウイルスの膜蛋白質が混在する標的抗原の免疫に有用である。本発明におけるウイルスの膜蛋白質とは、通常、出芽ウイルスの外被を構成する蛋白質を言う。バキュロウイルスであれば、たとえば、gp64と呼ばれる蛋白質が膜蛋白質に相当する。

たとえば、バキュロウイルスのgp64に対する免疫寛容を有するトランスジェニック非ヒト動物は、バキュロウイルス発現系で製造した免疫原の免疫動物として有用である。バキュロウイルス発現系は、様々な蛋白質を製造することができる。したがって、このトランスジェニック動物とバキュロウイルス発現系を組み合せて利用することによって、様々な蛋白質抗原を標的抗原として、容易に目的とする抗体を得ることができる。

本発明における免疫原は、標的抗原と背景抗原を含む。既に述べたとおり、標的抗原や背景抗原を構成する物質は特に制限されない。免疫寛容を有する免疫動物を、背景抗原をコードする遺伝子の導入によって得る場合には、背景抗原は蛋白質である。免疫原は、標的抗原と背景抗原以外の物質を含むことができる。

また本発明において、免疫原に含まれる背景抗原の種類は制限されない。したがって、標的抗原に対する抗体の産生を妨げる背景抗原が複数種含まれた免疫原を本発明に用いることもできる。免疫動物が各背景抗原に対していずれも免疫寛容を有していれば、これらの背景抗原の存在は問題とならない。あるいは、標的抗原に対する抗体の取得を実質的に妨げることがない背景抗原については、免疫動物の免疫寛容の有無に関わらず、免疫原に含まれることが許される。

一般に、標的抗原は生物材料に由来する物質からなる。生物材料は、様々な成分を含む複雑な混合物である。したがって、標的抗原は、通常、多様な混合物を原料として調製されている。その結果、標的抗原を高度に精製することは困難で

- 1 0 -

ある。言いかえれば、標的抗原を大量に、かつ高度に精製するには、多くの手間と時間を要する。つまり、免疫原が、標的抗原以外の物質を含むことは、事実上、避けられないといって良い。

具体的には、本発明の免疫原として、細胞、細胞培養液、細胞溶解物、ウイルス、あるいは未精製の抗原などを挙げることができる。細胞やウイルスなどは、その全体のみならず、その一部分のみを免疫原として用いることもできる。例えば、細胞膜やウイルスエンベロープ部分のみを免疫原として用いることも可能である。細胞やウイルスを用いる場合には、目的の抗原をコードする遺伝子を遺伝子組み換え技術により細胞やウイルスに導入して、目的の抗原を人為的に発現させたものを用いることができる。

本発明における望ましい免疫原の一つに、ウイルス粒子、またはその一部を示すことができる。ウイルスは、核酸と、限られた蛋白質や糖等の比較的単純な成分で構成されている。したがって、標的抗原の取得を妨害する背景抗原の種類も限られる。つまり、より少ない背景抗原についてのみ、免疫動物の免疫寛容を誘導すれば、本発明に基づく抗体の作製方法を実施することができる。

本発明において、免疫原として用いることができるウイルスの中では、たとえばバキュロウイルス(Baculovirus)が好ましい。バキュロウイルスは、2本鎖DNAからなるゲノムがキャップシド蛋白質に覆われた構造を有する昆虫ウイルスである。中でもバキュロウイルスの一種である核多角体病ウイルス(NPV)を利用した発現系は、外来性遺伝子の発現システムとして有用である。NPVは強力なプロモーター活性を有している。したがって、NPVのゲノムに外来性の遺伝子を組み込むことで、任意の蛋白質を大量に生産させることができる。具体的には、ポリヘドリンと呼ばれる蛋白質をコードする遺伝子を、任意の遺伝子に組み換えることによって、外来性の遺伝子の強力な発現が誘導される。

一方、バキュロウイルスに導入する外来性遺伝子には、任意の遺伝子を用いることができる。外来性遺伝子として、たとえば膜蛋白質をコードする遺伝子を用

- 11 -

いることもできる。

バキュロウイルスを用いることによって、ウイルスの膜蛋白質とともに目的の膜蛋白質を、その構造を維持した状態で発現させることができる。また、発現生成物を出芽ウイルスとして容易に回収できることも、バキュロウイルス発現系の大きな利点である。

膜蛋白質には、受容体やトランスポーターなどの、生物学的に重要な分子が多い。しかし、多くの膜蛋白質は、細胞膜に存在することによってその構造を維持している。また、糖鎖や脂質による翻訳後修飾を伴うことが多い。そのため膜蛋白質は、大腸菌などの原核生物を用いた発現系では、しばしば本来の構造を再現できない場合がある。

膜蛋白質等の外来性蛋白質のウイルス膜上への発現方法としては、例えば、W09 8/46777及びLoiselら(T.P.Loisel et al., Nature Biotech. 15: 1300-1304 (1997))の出芽バキュロウイルスを用いた膜タンパク質の発現方法を挙げることができる。より詳細には、外来性蛋白質をコードする遺伝子を含む昆虫細胞用の組換えベクターを作製し、バキュロウイルスDNAと共にSf9等の昆虫細胞へ導入する。すると、組換えベクターにコードされる外来性蛋白質は、感染細胞が死滅する前に感染細胞より細胞外に放出される成熟ウイルス粒子(ビリオン)上に発現され、外来性蛋白質を発現する組換えウイルスを得ることができる。

本発明において、出芽ウイルスとは出芽(budding)により感染細胞から放出されるウイルスのことである。一般に細胞膜を被ったウイルスは細胞が破壊されていない状態でも当該ウイルスに感染した細胞から発芽し、継続的に放出されるのに対し、膜を被らないアデノウイルスや、核膜を被ったヘルペスウイルスは細胞が破壊された時に一斉に放出される。本発明においては、特に出芽ウイルスが好ましい。また、本発明において組換えウイルスを感染させる宿主は、当業者であれば、用いるウイルスの種類に応じて、ウイルスの増殖を可能ならしめる宿主を適宜選択することができる。例えば、バキュロウイルスを用いる場合、Sf9等の昆虫

- 1 2 -

細胞の使用が考えられる。一般に、バキュロウイルス-昆虫細胞を用いたタンパク質発現系は、哺乳動物細胞と同様に脂肪酸アセチル化及び糖鎖付加等の翻訳と同時に翻訳後の修飾が行われること、並びに、哺乳動物細胞系よりも異種タンパク質の発現レベルが高いこと(Luckow V.A. and Summers M.D., Virol. 167: 56 (1988))から有利な系であると考えられている。

外来性蛋白質を発現しているウイルスは、例えば、外来性蛋白質をコードする遺伝子を含む組換えウイルスを感染させた宿主を培養することによって得ることができる。または、上述のW098/46777及びLoiselら(T.P.Loisel et al., Nature Biotech. 15: 1300-1304 (1997))の方法の様に、外来性蛋白質をコードする組換えベクターをバキュロウイルスと共に昆虫細胞に導入することにより、細胞外へ放出されるバキュロウイルスの膜上に外来性蛋白質を発現させることもできる。

また、Strehlowら(D. Strehlow et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 4209-4214(2000))の方法のように、外来性蛋白質をコードする遺伝子を導入したMoloneyウイルス由来ベクターより作製した組換えウイルスをPA317等のパッケージング細胞に感染させることにより、細胞外へ放出されるMoloney murine leukemiaウイルスの膜上に外来性蛋白質を発現させることができる。しかしながら、本発明の免疫原に用いることができる外来性蛋白質を発現しているウイルスは、これらの方

法により調製されたものに限定されない。

上述のようにして調製された組換えウイルスは、公知の手法により精製することができる。例えば、増加密度勾配遠心法(augment density gradient centrifugation)(Albrechisen et al., J. Virological Methods 28: 245-256 (1990); Hewish et al., J. Virological Methods 7: 223-228 (1983))、サイズ排除(size exclusion)クロマトグラフィー(Hjorth and Mereno-Lopez, J. Virological Methods 5: 151-158 (1982); Crooks et al., J. Chrom. 502: 59-68 (1990); Mento S. J. (Viagene, Inc.) 1994 Williamsburg Bioprocessing Conference)、モノクローナル抗体及びフコース硫酸含有多糖類等を利用したアフィニティーコロマトグラフィ

- 1 3 -

ー(Najayou et al., J.Virological Methods 32: 67-77 (1991); Diaco et al., J.Gen.Viro. 67: 345-351 (1986); Fowler, J.Virological Methods 11: 59-74 (1986); 特再表97/032010)、DEAEイオン交換クロマトグラフィー(Haruna et al., Virology 13: 264-267 (1961))等がウイルスを精製する方法として知られている。したがって、上述の方法、または、これらの方法を組み合せて精製しても良い。

本発明において、免疫動物を免疫寛容とするための寛容原となる背景抗原は、特に制限されない。免疫原中に含有量の多い物質や抗原性の強い物質などを寛容原とすることが好ましい。例えば、バキュロウイルスを免疫原として用いる場合には、gp64を寛容原とすることが好ましい。gp64は、ウイルス膜上に大量に発現しており、かつ免疫動物によって非自己と認識されやすい主要な背景抗原である。

バキュロウイルスは、外来性蛋白質の発現系としては望ましい特徴を有している。しかし一方で、発現産物を免疫原として用いる場合には、背景抗原の産生を伴うという問題点を有しているといえる。特に免疫原に用いるための膜蛋白質をバキュロウイルス発現系によって作製した場合には、gp64の存在が大きな問題となる。gp64はウイルスの膜蛋白質に大量に含まれている。そのため、外来性の膜蛋白質には、gp64の混入が避けられない。

本発明の抗体作製方法によれば、背景抗原による標的抗原に対する抗体取得の妨害作用を抑制することができる。したがって、本発明を用いれば、バキュロウイルス発現系の外来性蛋白質の発現システムとしての利点を、免疫原の作製においても十分に生かすことが可能となる。

本発明において、天然のウイルスやその部分を免疫原とすることもできる。天然のウイルスにおいても、ウイルスの特異的な検出や、感染の予防または治療において、特定の抗原決定基を認識する抗体は、重要である。そして、主要な抗原に対する抗体が生成されやすいのに対して、特定の抗原決定基を認識する抗体を得ることがしばしば困難であることも、先に述べたバキュロウイルス発現産物を免疫原に利用する場合と共通している。

- 1 4 -

天然のウイルスを本発明の免疫原として用いる場合には、ウイルスを構成する蛋白質のうち、背景抗原として作用する蛋白質をコードする遺伝子を非ヒト動物に導入してトランスジェニック動物とする。一方、免疫原としては、ウイルス粒子そのもの、あるいは標的抗原を含むウイルスの部分を用いる。こうして、標的抗原を認識する抗体を、効率的に得ることができる。

たとえばインフルエンザウイルスの表面抗原は、ウイルスの株を決定する重要な抗原である。インフルエンザの株ごとに、その株に固有の表面抗原を認識する抗体を容易に得ることができれば、ウイルスの同定や、感染の予防または治療に有用である。しかしウイルス粒子をそのまま免疫原とした場合には、ウイルスに共通する構造を認識する抗体が多く產生される。

本発明を利用して、インフルエンザウイルスに共通するエンベロープ蛋白質に対して免疫寛容としたトランスジェニック非ヒト動物を利用すれば、各株に固有の表面抗原を認識する抗体を効率的に得ることができる。すなわち、ウイルス株に固有の表面抗原を標的抗原とし、ウイルスに共通の構造を背景抗原として、本発明を応用することができる。

本発明の抗体作製方法の好ましい態様を次に述べる。この態様においては、膜蛋白質を標的抗原として用いる。膜蛋白質としては、ヒト由来の膜蛋白質などを用いることができる。

まず標的蛋白質をバキュロウイルス膜上に発現させ、該バキュロウイルスを免疫原として用いる。バキュロウイルスを用いた膜蛋白質の発現方法としては、例えば、W098/46777、特開2001-333773及びLoiselら(T. P. Loisel et al., Nature Biotech. 15: 1300-1304 (1997))の出芽バキュロウイルスを用いた膜蛋白質の発現方法を利用することができる。

より詳細には、膜蛋白質をコードする遺伝子を含む昆虫細胞用の組換えベクターを作製し、バキュロウイルスDNAと共に昆虫細胞へ導入する。昆虫細胞には、Sf9細胞等が利用される。組換えベクターにコードされる膜蛋白質は、感染細胞が死

- 1 5 -

滅する前に感染細胞より細胞外に放出される成熟ウイルス粒子（ビリオン）上に発現される。したがって成熟ウイルス粒子の回収によって、膜蛋白質（標的抗原）を発現している出芽バキュロウイルスを得ることができる。培養細胞から出芽バキュロウイルスを回収する方法も公知である。このようにして得た膜蛋白質（標的抗原）を発現している出芽バキュロウイルスを本発明における免疫原として用いる。

バキュロウイルス膜上には膜蛋白質（標的抗原）以外にもバキュロウイルス由来の膜蛋白質が発現していることは既に述べたとおりである。特にgp64はバキュロウイルス膜上に大量に発現しており、かつ抗原性が高い。したがって出芽バキュロウイルスを免疫すると抗gp64抗体が產生されてしまい、膜蛋白質（標的抗原）に対する抗体を効率よく取得できない。

そこで本発明においては、免疫動物として、gp64を発現する動物を用いる。具体的には、gp64をコードする遺伝子を含むベクターの導入によってgp64を発現するトランスジェニック動物を作製する。トランスジェニック動物としては、非ヒト動物が用いられる。たとえば、gp64遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが本発明における免疫動物に用いられる。

本発明においては、該トランスジェニックマウスが、先に取得した出芽バキュロウイルスで免疫される。gp64発現トランスジェニックマウスはgp64をEndogenousに発現するので、背景抗原であるgp64に対して免疫寛容になっている。つまり出芽バキュロウイルスで免疫したときの、抗gp64抗体の產生が抑制される。その結果、標的抗原である膜蛋白質に対する抗体を効率よく產生することができる。

トランスジェニックマウスの作製方法は公知である。例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:7380-7384(1980)に記載の方法により、トランスジェニックマウスを得ることができる。具体的には、目的の遺伝子を哺乳動物の全能細胞に導入し、この細胞を個体へと発生させる。得られた個体のうち、体細胞および生殖細胞中に導入遺伝子が組み込まれてた個体を選別することによって、目的とするト

- 1 6 -

ランスジェニックマウスを作製することができる。遺伝子を導入する全能細胞としては、受精卵や初期胚のほか、多分化能を有するES細胞のような培養細胞などが挙げられる。

より具体的には、たとえば後で述べる実施例の方法により作製できる。

本発明の抗体の作製方法は、モノクローナル抗体やポリクローナル抗体の作製に利用することができる。免疫動物から標的抗原に対する抗体を採取することによって、ポリクローナル抗体を得ることができる。あるいは、免疫動物の抗体産生細胞をクローン化することによって、モノクローナル抗体を產生する抗体産生細胞を得ることもできる。

更に、マウスなどの免疫動物に由来する抗体、あるいはその遺伝子を利用して、免疫動物とヒトのキメラ抗体や、ヒト型化抗体を得ることもできる。これらの改変された構造を有する抗体の作製方法も公知である。

更に本発明は、本発明の方法によって得ることができる抗体に関する。本発明の抗体は、上記のような方法を含む工程によって得ることができるあらゆる抗体を含む。したがって、たとえばモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、免疫動物とヒトのキメラ抗体、ヒト型化抗体、あるいはヒト抗体は、いずれも本発明に含まれる。たとえば、免疫システムをヒトの免疫システムに置換されたランスジェニックマウスが公知である。このようなマウスに免疫することによって得ることができる抗体は、ヒト抗体である。

本発明における好ましい抗体として、ヒト膜蛋白質を認識する抗体を示すことができる。膜蛋白質は、創薬ターゲットとして重要なものが多くの含まれる。一方で、精製が困難なために、特異的な抗体を得ることが難しいとされていた。しかし本発明によって、遺伝子組み換えによって作製された、背景抗原と共に存した状態にある膜蛋白質であっても、目的とする抗体を効率良く得ることが可能となつた。膜蛋白質としては、たとえばPepT1は重要な分子である。PepT1の塩基配列、アミノ酸配列は既に知られている（ヒトPepT1 : GenBank XM_007063, J. Biol. Chem.

- 1 7 -

270(12): 6456-6463 (1995); マウスPepT1: GenBank AF205540, Biochim. Biophys. Acta. 1492: 145-154 (2000)）。

PepT1に対する抗体の中でも、PepT1の細胞外領域に結合する抗体は有用である。特にPepT1の細胞外領域に特異的に結合する抗体は、本発明による望ましい抗体である。本発明において、細胞外領域に対する特異的な結合とは、PepT1の細胞外領域とそれ以外の領域を免疫学的に識別しうることを言う。より具体的には、細胞外領域には結合するが、細胞内領域等や膜貫通ドメインとは結合しない抗体を、PepT1の細胞外領域に特異的に結合する抗体と言うことができる。本発明において、好ましいPepT1は、ヒトPepT1である。ヒトPepT1は、ヒトに由来のみならず、ヒトPepT1をバキュロウイルス発現系で発現させて得ることができる組み換え体であることもできる。

免疫原に用いられるヒトPepT1は、標的抗原の構造を維持していれば、必ずしも完全な分子である必要はない。たとえば、PepT1の細胞外領域を含む断片を免疫原としてもできる。本発明における免疫原として好ましいPepT1は、トランスポート活性を有するヒトPepT1、または全長ヒトPepT1である。中でも、トランスポート活性を有する全長ヒトPepT1は特に好ましい。ヒトPepT1のトランスポート活性は、基質を細胞内に取り込む作用を指標として検知することができる。PepT1はグリシルザルコシン等を基質として取りこむことが知られている。グリシルザルコシンの取りこみは、 $[^{14}\text{C}]$ グリシルザルコシン等を利用することにより評価することができる。

ヒトPepT1は膜上（例えば、ウイルス膜や細胞膜など）に発現していることが好ましい。ウイルス膜上に発現させたPepT1のトランスポート活性は、ウイルス溶液と基質とを接触させ、ウイルスによる基質の取りこみを観察することによって検出することができる。

免疫から抗体取得までの方法は公知の方法を用いることができる。免疫原による動物の免疫は、公知の方法にしたがって行われる。一般的方法としては、感作

- 1 8 -

抗原を哺乳動物の腹腔内又は皮下に注射する。具体的には、免疫原をPBS(Phosphate-Buffered Saline)や生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したものに対し、所望により通常のアジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与する。アジュバントには、たとえばフロイント完全アジュバントが用いられる。さらに、その後、フロイント不完全アジュバントに適量混合した免疫原を、4~21日毎に数回投与することが好ましい。

また、免疫原の免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。

目的の抗体を得るために、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、免疫した動物の血液を採取する。そして採取した血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離して、これを使用してもよい。

例えば、目的の抗原をカップリングさせたアフィニティーカラムを用いて、目的の抗原のみを認識する画分を得て、さらにこの画分をプロテインAあるいはプロテインGカラムを利用して精製することにより、免疫グロブリンGあるいはMを調製することができる。

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から抗体産生細胞を採取してクローニングする。抗体産生細胞としては、たとえば脾細胞を用いることができる。抗体産生細胞のクローニングには、細胞融合法を用いることができる。前記抗体産生細胞と融合される他方の親細胞としては、たとえば哺乳動物のミエローマ細胞が用いられる。より好ましくは、融合細胞（ハイブリドーマ）の選択マーカーとなる、特殊な栄養要求性や薬剤耐性を有するミエローマ細胞が挙げられる。

前記抗体産生細胞とミエローマ細胞は、基本的には公知の方法に準じて細胞融

- 1 9 -

合させることができる。細胞融合を利用したモノクローナル抗体の作製方法は、たとえばミルステインらによって確立されている(Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46)。

細胞融合により得られたハイブリドーマは、選択培養液で培養することにより選択される。選択培養液は、細胞融合に用いたミエローマ細胞の特性などに応じて選択される。選択培養液としては、たとえば、HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジンを含む培養液）が用いられる。ハイブリドーマは、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、当該HAT培養液で培養される。通常、数日～数週間培養を継続することにより、ハイブリドーマを選択することができる。次いで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を產生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングを行う。

次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスの腹水としてモノクローナル抗体を回収することができる。腹水からモノクローナル抗体を精製することもできる。モノクローナル抗体の精製には、例えば、硫安沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、目的の抗原をカップリングしたアフィニティーカラムなどを利用することができる。

ハイブリドーマを用いて抗体を產生する以外に、抗体を產生する感作リンパ球等の抗体產生細胞を癌遺伝子(oncogene)やウイルスなどを用いること等により不死化させた細胞を用いることもできる。細胞を不死化するためのウイルスとしては、エプスタインバーウィルス(EBV)などを用いることができる。

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて產生させた組換え型抗体と/orすることができる（例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ、または抗体を產生する感作リンパ球等の抗体産

- 2 0 -

生細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し產生させる。本発明は、この組換え型抗体を包含する。

さらに、本発明の方法により得られた抗体は、その抗体断片や抗体修飾物であつてよい。たとえば、抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv又は重鎖と軽鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェインFv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883)が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させることによって、抗体断片を得ることができる。または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976；Bettler, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496；Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515；Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663；Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669；Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照）。

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール(PEG)等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明の「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

また、ヒト抗体の取得方法も知られている。ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を目的の抗原で免疫することで目的のヒト抗体を取得することができる（国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照）。

また、本発明の方法により得られた抗体は、免疫動物に由来する非ヒト抗体由來の可変領域とヒト抗体由來の定常領域からなるキメラ抗体とすることができる。

- 2 1 -

また免疫動物に由来する非ヒト抗体のCDR（相補性決定領域）とヒト抗体由来のFR（フレームワーク領域）および定常領域からなるヒト型化抗体とすることもできる。

これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。具体的には、たとえばキメラ抗体は、免疫動物の抗体の重鎖、および軽鎖の可変領域と、ヒト抗体の重鎖および軽鎖の定常領域からなる抗体である。免疫動物由来の抗体の可変領域をコードするDNAを、ヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることによって、キメラ抗体を得ることができる。

ヒト型化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称される改変抗体である。ヒト型化抗体は、免疫動物由来の抗体の相補性決定領域（CDR； complementarity determining region）を、ヒト抗体の相補性決定領域へ移植することによって構築される。その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（framework region； FR）を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることによりヒト型化抗体を得られる（欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号W0 96/02576参照）。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

更に、免疫動物の抗体産生細胞から、抗体をコードする遺伝子を取得することができる。抗体をコードする遺伝子を取得する方法は、制限されない。たとえば、可変領域やCDRをコードする遺伝子を鑄型として、PCR法によって当該遺伝子を増

- 2 2 -

幅することによって抗体をコードする遺伝子を得ることができる。抗体遺伝子をPCR法によって増幅するためのプライマーが公知である。得られた遺伝子を適當な発現系を用いて発現させることによって、目的とする抗体を製造することができる。あるいは、本発明によって得られた遺伝子を、先に述べた種々の改変抗体を製造するために利用することもできる。

前記のように得られた抗体は、均一なイムノグロブリン分子にまで精製することができる。精製方法は、特に限定されない。本発明で使用される抗体の分離、精製は通常のポリペプチドで使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、イムノグロブリンを分離、精製することができる(Antibodies : A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。上記で得られた抗体の濃度は、吸光度の測定、または酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA)等により測定することができる。

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia)等が挙げられる。

アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる(Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーはHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

- 2 3 -

図面の簡単な説明

図1および図2は、構築したgp64遺伝子の塩基配列を表す図である。

図3は、実施例において構築したpCAG-gp64ベクターの構造を表す図である。

図4は、Founderマウスの精巣を示す写真である。

図5は、ノーザンプロット法によるmRNA発現解析の結果を示す写真である。図中のHは心臓、Bは脳、Iは腸、Mは筋肉を表す。

図6は、Anti-Mouse IgGによるウェスタンプロット解析の結果を示す写真である。図中、preは免疫前採血、2ndは2回免疫後採血を表す。

gp64TgM:トランスジェニックマウス、wtBALB/c:non-トランスジェニックマウス

図7は、Anti-Mouse IgMによるウェスタンプロット解析の結果を示す写真である。

gp64TgM:トランスジェニックマウス、wtBALB/c:non-トランスジェニックマウス

図8は、マウス血清中のpepT1特異的抗体の抗体価をFACSによって解析した結果を表す図である。図中、縦軸は細胞数（対数）を、また横軸は蛍光強度を示す。

(上) マウス#1、(下) マウス#2

図9は、図8と同じ実験の結果を表す図である。(上) マウス#3、(下) 抗体なし

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

1) gp64トランスジェニックベクターの構築

gp64の塩基配列を配列番号：3に、またgp64遺伝子によってコードされるアミノ酸配列を配列番号：4に示す（GenBank Acc No. 9627742）。gp64の遺伝子配列を鋳型としEcoRI認識配列とKozak配列を5'末端に有する5' primer 64F1（配列番号：1）とEcoRI認識配列を5'末端に有する3' primer 64R1（配列番号：2）を用

- 2 4 -

い(図1および図2)、以下の条件でPCRを行った。

PCR反応溶液の組成は、x10 ExTaq buffer 5 μL, ExTaq付属dNTP 4 μL, 10 μmol e/L 64F1 1 μL, 10 μmole/L 64R1 1 μL, 500 pg/μL pBac-N-blue 1 μL, 5 unit/μL ExTaq 0.5 μL, diw 37.5 μLとした。反応シーケンスは次のとおりである。

94°C 5min →

(94°C 15sec, 57°C 30sec, 72°C 30sec) x 25 cycles →

72°C 7min. →

4°C forever

増幅されたバンドをpGEM-Teasyにサブクローニング後、E.coli DH5 α をトランスフォームした。T7およびSP6プライマーを用いてcolony PCRを行い、インサートが確認されたクローンを用いてABI Prism377 DNA sequencerとBigDye Cycle Sequence kitとT7プライマーあるいはSP6プライマーにより塩基配列を解析し目的の遺伝子を含むクローンを確認した。このクローンから塩基配列に変異が入っていないことを確認したgp64を含む断片をEcoRIにより切り出し、同じくEcoRIカットしたpCAGGS1に挿入し、E.coli DH5 α をトランスフォームした。設計通りのクローンを250 mLのLB培地を用い37°Cで一晩培養し、Endofree MAXI kitを用いて精製し58 1.6 μgのプラスミドを得た。

2) 遺伝子の導入

インジェクション用DNAフラグメントは、次のようにして調製した。まずgp64遺伝子を挿入したpCAGGSベクター(pCAG-gp64; 図3)を、SalIおよびPstIで処理した後、gp64遺伝子を含む断片(約3.8kb)を取り出した。この断片(約3.8kb)を、Gel Extraction Kit (QIAGEN)により回収し、3 ng/μlになるようにPBSで希釈してインジェクション用DNAフラグメントとした。

DNAフラグメントを注入するマウス前核期卵は、次のようにして回収した。すなわち、まずBALB/c系雌マウス(日本クレア)に5 i.uのPMSGを腹腔内投与、さらに48時間後5 i.uのhCGを腹腔内投与することによって、過排卵処理した。この雌マウ

- 2 5 -

スを同系統の雄マウスと交配させた。交配の翌朝、プラグを確認したマウスの卵管を灌流してマウス前核期卵を回収した。

インジェクション用DNAフラグメントは、マイクロマニピュレーターを用いて前核期卵へ注入した（ジーンターゲティングの最新技術（羊土社）、190-207 200）。DNAフラグメントを373個のBALB/c胚へ注入し、翌日、2細胞期に発生していた胚216個を、偽妊娠1日目の受容雌の卵管に片側当たり10個前後（1匹あたり20個前後）を移植した。

分娩予定日に至っても産仔を娩出しなかった受容雌については、帝王切開を施し里親に哺育させた。結果を表1にまとめた。50例の産仔が得られ、そのうちの4例がgp64遺伝子が導入されたトランスジェニックマウス（以下、Tgmと記載する）であった。以下、最初に得られたマウスをFounderと記載する。

表1

	生存卵数/注入卵数	移植数	着床数	産仔数(♀, ♂)	離乳数(♀, ♂)	Founder
1st	59/63	55	20	9 (4, 5)	9 (4, 5)	0
2nd	186/223	161	57	26 (13, 13)	25 (13, 12)	♂3
3rd	61/87	56	35	15 (9, 6)	15 (9, 6)	♂1
Total	306/373	216	107	50 (25, 25)	49 (25, 24)	♂4

Founderは全て雄マウスで、これら4ラインの内2ライン（No. 30, No. 31）から、それぞれ4匹、20匹の産仔（F1マウス）が得られた。得られたF1マウスの遺伝子型解析を行ったところ、ライン30ではTgmが3例存在しており、gp64遺伝子の次世代への伝達を確認した。しかしながら、ライン31では20例全例においてgp64遺伝子が確認されない野生型のマウス（non-Tgm）であったことから、ライン31のFounderマウスはgp64遺伝子がモザイク状態で挿入されたマウスであったと思われた。また、ライン34、46のFounderマウスは繁殖能がなく、全く産仔が得られなかった。ライン30のFounderマウスについても、交配開始直後の1腹分のみ相手雌を妊娠さ

- 2 6 -

せることができたが、これ以降全く産仔が得られなくなってしまった（表2）。

表2

ライン no.	生月日	性別	導入遺伝子数	産仔（出生日、産仔数、 Tg）			備考
30	010709	♂	10数コピー	010926	♀3、♂1	♀3	1産させた後は産仔得 られなくなった。精巣 は小さく精子は存在せ ず
31	010709	♂	2-3コピー	010927	♀3、♂5	0	モザイク
				011022	♂2	0	
				011108	♀4、♂6	0	
34	010709	♂	2-3コピー	繁殖能な し	-	-	精巣は小さく精子存在 せず
46	010821	♂	2-3コピー	繁殖能な し	-	-	精巣は小さく精子存在 せず

そこで、体外受精を行うため、ライン30、34、46のFounderマウスの精子採取を試みたが、これら3例とも精巣が異常に小さく（図4）、精巣上体尾部には精子が存在せず、体外受精を行うことはできなかった。以上の結果から、gp64蛋白質が、マウス造精能に影響を与えることが発見された。従ってgp64は避妊等に応用できる可能性があると考えられる。

3) 導入遺伝子の確認

3週齢になった時点でマウスの尾からDNAを、核酸自動分離装置（KURABO）を用い抽出し、サザンプロット法およびPCR法による導入遺伝子の確認を行った。サザンプロット法による導入遺伝子の確認は、15 μgのgenome DNAをEcoRI処理、泳動後、ナイロンメンブレンへトランスファーし、EcoRI処理したpCAG-gp64ベクターのgp64を含む約1.5kbの断片をプローブに用い、トランスファーしたDNAとハイブリダイズさせることにより行った。また約100ngのDNAをテンプレートとし、次の

- 2 7 -

プライマーを用いたPCR法によって導入遺伝子を確認した。

センスプライマー64F1（配列番号：1）：

GAATTCCACCATGGTAAGCGCTATTGTT

アンチセンスプライマー64R1（配列番号：2）：

GAATTCTTAAATATTGTCTATTACGGT

PCRの反応シーケンスは次のとおりである。

94°C 5min →

(94°C 15sec, 57°C 30sec, 72°C 30sec) x 35 cycles →

72°C 7min →

4°C forever

PCR産物を泳動し、約1.5kbのバンドの有無に基づいて導入遺伝子を確認した。

4) gp64Tgmにおけるgp64遺伝子の発現確認

gp64遺伝子の次世代への伝達が確認できたライン30のFounderマウスにおいて、ノーザンプロット法によってgp64遺伝子の発現を確認した。Total RNAを、ISOGEN（ニッポンジーン）を用いて、心臓、脳、小腸、大腿筋の4臓器より回収した。20 μgのtotal RNAを電気泳動し、ナイロンメンブレンへトランスファーした。EcoRI処理したpCAG-gp64ベクターのgp64を含む約1.5kbの断片をプローブとした。ベクター構造から予想されるバンドは1.5k程度である。

結果を図5に示した。少なくとも心臓、脳、大腿筋でその発現が確認できた。

バンドが3本見られたが、その原因は不明である。

5) ライン30雌Tgmの繁殖能（マウスの交配）

8週齢になった時点で同系統のマウスとの交配を開始した。

その結果、3匹のF1雌マウスから各2産の産仔、合計で31匹（♀14、♂17）の産仔（F2）が得られた（表3）。得られた産仔のうち、14匹（♀5、♂9）がTgmであった。また、3産目の産仔も得られており、雌Tgmの繁殖能は正常であった。

- 2 8 -

表3

性別	個体番号	産次回数	産仔数 (non-tg)	産仔数 (Tg)
♀	1	2	♀3 ♂1	♀1 ♂6
♀	2	2	♀4 ♂3	♀2 ♂1
♀	3	2	♀2 ♂4	♀2 ♂2

6) PepT1発現出芽バキュロウイルスの調製

免疫原として用いる、PepT1発現出芽バキュロウイルスを次のようにして調製した。PepT1は、膜蛋白質であるトランスポーターである。PepT1の構造は公知である(GenBank XM_007063、J.Biol.Chem. 270(12): 6456-6463 (1995))。

ヒト腎臓ライブラリーからPCRを用いて完全長のPepT1遺伝子を単離した。完全長のヒトPepT1遺伝子をpBlueBacHis2A (Invitrogen) に挿入することでトランスマーカーpBlueBacHis-PepT1を作製した後、Bac-N-Blue transfection kit (Invitrogen) を用いてBac-N-Blue DNAと共にトランスマーカーをSf9細胞に導入することでヒトPepT1発現用組換えウイルスを調製した。即ち、4 μgのpBlueBacHis-PepT1をBac-N-Blue DNAに加え、さらに1mLのGrace's培地(GIBCO) 20 μLのCell FECTIN試薬を加え、混和し、室温で15分間静置した後、Grace's培地で1回洗浄した2×10⁶個のSf9細胞に滴下した。室温で4時間静置した後、さらに2mLの完全培地(10%ウシ胎児血清(Sigma社製)、100units/mLのペニシリン、及び100 μg/mLストレプトマイシン(GIBCO-BRL社製)を含むGrace's培地)を加え、27°Cで培養した。相同組換えにより作製されたヒトPepT1発現用組換えウイルスはキット添付の指示書に従い二度の純化を行った後、組換えウイルスのウイルスストックを得た。

ヒトPepT1を発現する出芽型ウイルスの調製は以下のようにして行った。すなわち、上記により調製した組換えウイルスをMOI=5となるように500mLのSf9細胞(2×10⁶/mL)に感染させた。27°Cで3日間培養した後、培養液を800×gで15分間遠心分離し、細胞ならびに細胞破碎物を除去した。遠心分離により回収した上清は45,

- 2 9 -

000×gで30分間遠心した後、沈殿物をPBSに懸濁し、さらに800×gで15分遠心することで細胞成分を除去した。上清は再度45,000×gで30分間遠心した後、沈殿物をPBSに再懸濁したものが出芽型ウイルス画分とした。ウイルスならびにSI-9細胞膜上でのPepT1発現は抗His抗体を用いたウエスタン解析で確認した。また、タンパク質濃度はDc Protein Assay kit (Bio-Rad) を用い、BSAを標準物として測定した。

7) マウスの免疫

Difcoのフロイント完全アジュバントと不完全アジュバントを用いて常法に従つてエマルジョンを作製した免疫原を皮下投与して免疫した。初回免疫量は1mg/miceで、2回免疫量は0.5mg/miceとした。また2回免疫は初回免疫から14日後に行った。初回免疫から17日後に眼窩採血し、血清を採取した。

8) Western blotによるgp64に対するトレランスの確認

pepT1-BVを12% Gelを用いて1 μ g/laneで還元条件下SDS-PAGEを行った。泳動後PVDF膜にエレクトロプロットした。この膜に1/1000希釀した血清を反応させ、順次洗浄を挟み、1/1000希釀Biotin-Anti-Mouse IgG(γ) (Zymed) とStreptavidin-Alkaline Phosphatase (Zymed) を反応させた。発色はアルカリホスファターゼ染色キット(ナカライト)を用いて行った。gp64検出用の陽性コントロール抗体はNOVAGENから購入して用いた。

結果を図6に示す。Anti-Mouse IgGによる染色ではnon-トランスジェニックマウスでは2匹とも強く染色されていた。一方gp64トランスジェニックマウスでは3匹ともgp64が染まるものの染色の度合いは弱く、抗gp64抗体量がnon-トランスジェニックマウスに比べ相当少ないことが確認された。Anti-Mouse IgMによる染色ではnon-トランスジェニックマウスが2匹とも弱く染色されているのに対し、gp64トランスジェニックマウスでは非常に弱いか全く染色されないことが確認された(図7)。

8) gp64TgMによる抗pepT1抗体作製

- 3 0 -

初回免疫は以下の手順で行った。 pepT1-BV 1mg及びpertussis toxin 100ngが入ったPBS 200 μ Lを皮下投与した。2回目以降の免疫はPBSに懸濁したpepT1-BV 0.5 mgを皮下投与した。

細胞表面にpepT1を発現しているBa/F3細胞（以後Ba/F3-pepT1とする）とBa/F3細胞をPBSで2回洗浄した。それぞれの細胞 10^6 個にPBSで220倍に希釈したマウス血清100 μ Lを加え、on iceで30分間反応させた。500 μ LのPBSで1回洗浄後、PBSで200倍に希釈したFITC-抗マウスIgGを100 μ L加え、on iceで30分間反応させた。遠心後回収した細胞を500 μ LのPBSに懸濁し、FACSにより解析した。5回免疫後のFACSによる解析の結果を図8および図9に示す。図中、Ba/F3細胞の結果を実線で、Ba/F3-pepT1細胞の結果を点線で示した。

以上の結果より、pepT1-BVを免疫したマウスの血清中のpepT1特異的に反応する抗体の抗体価が上昇している事が確認された。

産業上の利用の可能性

本発明によって、背景抗原をともなった標的抗原を用いて、標的抗原に対する抗体を効率的に得ることができる。本発明の抗体作製方法は、背景抗原の混入を避けることができない免疫原を用いた抗体作製において有用である。

たとえばバキュロウイルス発現系として知られる外来遺伝子発現システムは、組み換え蛋白質を容易に、かつ大量に得るための方法として有用である。特に膜蛋白質に応用した場合には、バキュロウイルス発現系は、膜蛋白質とウイルス粒子の膜蛋白質とともに、構造を維持した状態で回収することができる優れた発現システムである。しかし一方でその発現産物を免疫原として用いる場合には、gp64が背景蛋白質となって標的蛋白質に対する抗体の取得を妨げるという問題点を伴っていた。

本発明の抗体製造方法を利用すれば、バキュロウイルス発現系によって得られた蛋白質における背景抗原の影響を効果的に抑制することができる。その結果、

- 3 1 -

パキュロウイルス発現系によって大量に得ることができる膜蛋白質抗原を標的抗原に用いて、効率的に抗膜蛋白質抗体を製造することができる。

膜蛋白質には、受容体、あるいは細胞接着因子等の、機能的に重要な蛋白質が多い。したがって膜蛋白質を認識する抗体は、その機能解析、局在の解析、定量、診断、あるいは膜蛋白質の活性を制御する治療剤開発において、重要な役割が期待される。

一方で、免疫原として利用可能な膜蛋白質を得ることは一般に難しいとされていた。しかし本発明を利用すれば、パキュロウイルス発現系などによって作製された大量の膜蛋白質を、背景抗原を伴ったまま免疫原として利用することができる。その結果、これまで作製が困難としてきた、様々な膜蛋白質の抗体を容易に、しかも効率的に得ることができる。

本発明の抗体作製方法は、抗体を用いた膜蛋白質の機能解析や診断、膜蛋白質の活性の制御に基づく医薬品の開発に貢献する。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

- 3 2 -

請求の範囲

1. 免疫原に含まれている背景抗原に対して免疫寛容を有する非ヒト動物を、標的抗原と背景抗原を含む免疫原で免疫し、標的抗原に対する抗体または抗体をコードする遺伝子を取得する工程を含む標的抗原を認識する抗体の作製方法。
2. 免疫寛容を人為的に誘導することを特徴とする請求項1に記載の方法。
3. 非ヒト動物がトランスジェニック非ヒト動物である請求項1に記載の方法。
4. 以下の工程を含む、標的抗原に対する抗体の作製方法。
 - (a) 標的抗原と背景抗原を含む免疫原を調製する工程、
 - (b) 背景抗原をコードする遺伝子を発現可能に保持したトランスジェニック非ヒト動物を作製する工程、
 - (c) (a)の免疫原を(b)のトランスジェニック非ヒト動物に投与する工程、および
 - (d) トランスジェニック非ヒト動物から標的抗原に対する抗体を採取する工程
5. 免疫原がウイルス粒子、またはその一部である請求項4に記載の方法。
6. ウィルスがバキュロウイルスである請求項5に記載の方法。
7. 標的抗原が膜蛋白質である請求項4に記載の方法。
8. 背景抗原がgp64である請求項6に記載の方法。
9. 非ヒト動物がマウスである請求項4に記載の方法。
10. 請求項1～9のいずれかに記載の方法により作製された抗体。
11. 請求項10に記載の抗体を元にして作製した非ヒト動物－ヒトキメラ抗体、またはヒト型化抗体。
12. ウィルス由来膜蛋白質をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニック非ヒト動物。
13. ウィルスがバキュロウイルスである請求項12に記載のトランスジェニ

- 3 3 -

ック非ヒト動物。

- 1 4. ウィルス由来膜蛋白質がgp64である請求項1 3に記載の非ヒト動物。
- 1 5. 非ヒト動物がマウスである請求項1 2に記載の非ヒト動物。
- 1 6. ウィルス由来蛋白質を含む抗原に対する抗体製造用である、請求項1 2に記載の非ヒト動物。
- 1 7. 背景抗原をコードする遺伝子を導入したトランスジェニック非ヒト動物を作製する工程を含む非ヒト免疫動物の製造方法。
- 1 8. 請求項1 7に記載の方法によって製造された、背景抗原を含む標的抗原に対する抗体を得るための非ヒト免疫動物。
- 1 9. 次の工程を含む、PepT1に対する抗体の製造方法。
 - a) PepT1またはその断片をコードするDNAを発現可能に保持したバキュロウイルスを調製する工程
 - b) a) のバキュロウイルスを宿主細胞に感染させ、PepT1またはその断片を発現した出芽ウイルスを得る工程
 - c) バキュロウイルスの膜蛋白質gp64をコードする遺伝子を発現可能に保持したトランスジェニック非ヒト動物を作製する工程
 - d) c) のトランスジェニック非ヒト動物にb) の出芽ウイルスまたはPepT1またはその断片を含む分画を免疫する工程、および
 - e) 免疫動物から、PepT1を認識する抗体を回収する工程

図 1

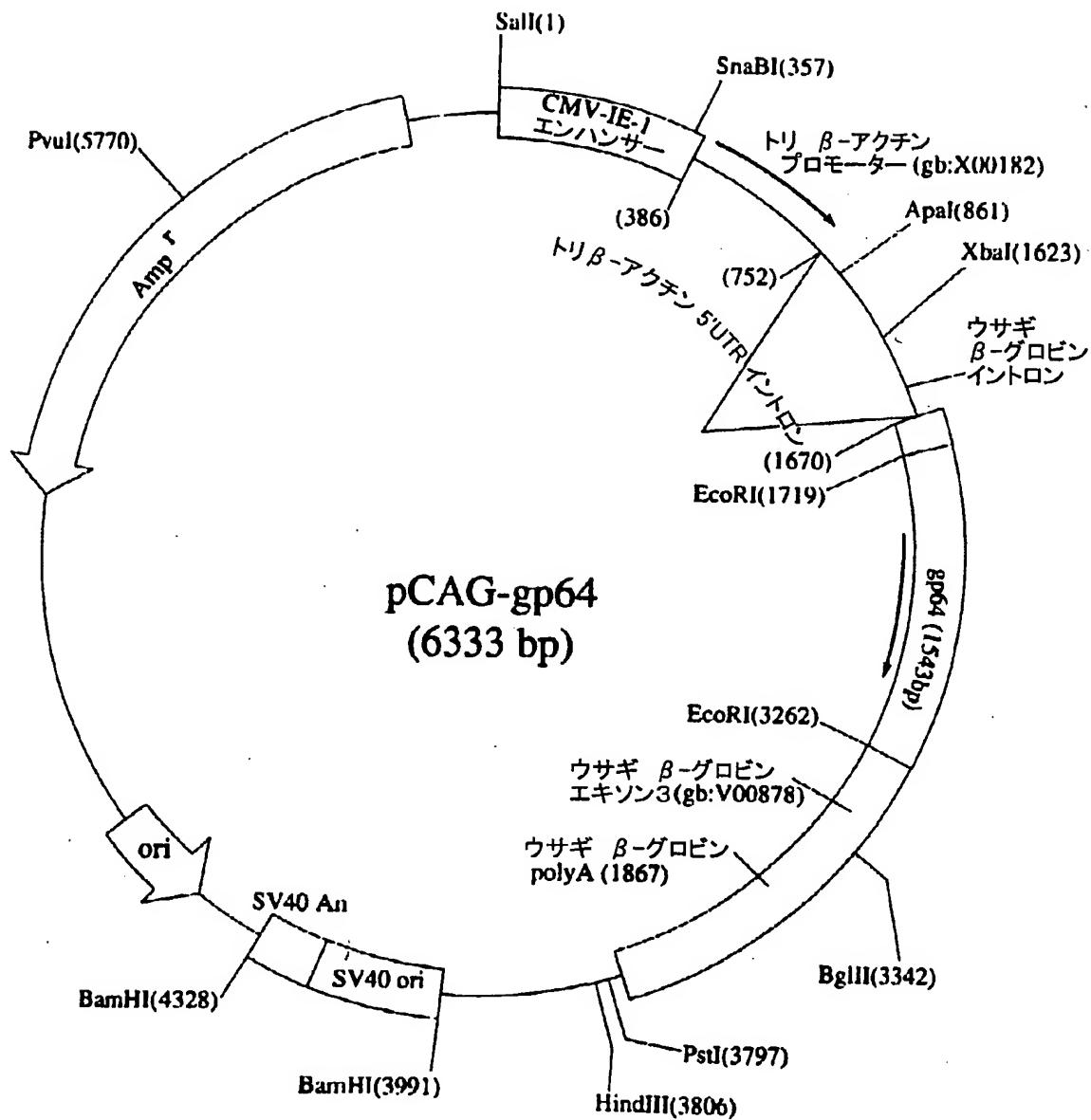
EcoRI KOZAK	
g aat tcc acc	0
Asn Ser Thr	
.....	
配列番号 : 3	
atg gta agc gct att gtt tta tat gtg ctt ttg gcg gcg gcg cat	48
Met Val Ser Ala Ile Val Leu Tyr Val Leu Leu Ala Ala Ala His	
配列番号 : 4	
.....	
64F1/ 配列番号 : 1	
tct gcc ttt gcg gcg gag cac tgc aac gcg caa atg aag acg ggt ccg	96
Ser Ala Phe Ala Ala Glu His Cys Asn Ala Gln Met Lys Thr Gly Pro	
.....	
tac aag att aaa aac ttg gac att acc ccg ccc aag gaa acg ctg caa	144
Tyr Lys Ile Lys Asn Leu Asp Ile Thr Pro Pro Lys Glu Thr Leu Gln	
.....	
aag gac gtg gaa atc acc atc gtg gag acg gac tac aac gaa aac gtg	192
Lys Asp Val Glu Ile Thr Ile Val Glu Thr Asp Tyr Asn Glu Asn Val	
.....	
att atc ggc tac aag ggg tac tac cag gcg tat gcg tac aac ggc ggc	240
Ile Ile Gly Tyr Lys Gly Tyr Tyr Gln Ala Tyr Ala Tyr Asn Gly Gly	
.....	
tcg ctg gat ccc aac aca cgc gtc gaa gaa acc atg aaa acg ctg aat	288
Ser Leu Asp Pro Asn Thr Arg Val Glu Glu Thr Met Lys Thr Leu Asn	
.....	
gtg ggc aaa gag gat ttg ctt atg tgg agc atc agg cag cag tgc gag	336
Val Gly Lys Glu Asp Leu Leu Met Trp Ser Ile Arg Gln Gln Cys Glu	
.....	
gtg ggc gaa gag ctg atc gac cgt tgg ggc agt gac agc gac gac tgt	384
Val Gly Glu Glu Leu Ile Asp Arg Trp Gly Ser Asp Ser Asp Asp Cys	
.....	
ttt cgc gac aac gag ggc cgc ggc cag tgg gtc aaa ggc aaa gag ttg	432
Phe Arg Asp Asn Glu Gly Arg Gln Trp Val Lys Gly Lys Glu Leu	
.....	
gtg aag cgg cag aat aac aat cac ttt gcg cac cac acg tgc aac aaa	480
Val Lys Arg Gln Asn Asn Asn His Phe Ala His His Thr Cys Asn Lys	
.....	
tcg tgg cga tgc ggc att tcc act tcg aaa atg tac agc agg ctc gag	528
Ser Trp Arg Cys Gly Ile Ser Thr Ser Lys Met Tyr Ser Arg Leu Glu	
.....	
tgc cag gac gac acg gag tgc cag gta tac att ttg gac gct gag	576
Cys Gln Asp Asp Thr Asp Glu Cys Gln Val Tyr Ile Leu Asp Ala Glu	
.....	
ggc aac ccc atc aac gtg acc gtg gac act gtg ctt cat cga gac ggc	624
Gly Asn Pro Ile Asn Val Thr Val Asp Thr Val Leu His Arg Asp Gly	
.....	
gtg agt atg att ctc aaa caa aag tct acg ttc acc acg cgc caa ata	672
Val Ser Met Ile Leu Lys Gln Lys Ser Thr Phe Thr Thr Arg Gln Ile	
.....	
aaa gct gcg tgt ctg ctc att aaa gat gac aaa aat aac ccc gag tcg	720
Lys Ala Ala Cys Leu Leu Ile Lys Asp Asp Lys Asn Asn Pro Glu Ser	
.....	
gtg aca cgc gaa cac tgt ttg att gac aat gat ata tat gat ctt tct	768
Val Thr Arg Glu His Cys Leu Ile Asp Asn Asp Ile Tyr Asp Leu Ser	
.....	
aaa aac acg tgg aac tgc aag ttt aac aga tgc att aaa cgc aaa gtc	816
Lys Asn Thr Trp Asn Cys Lys Phe Asn Arg Cys Ile Lys Arg Lys Val	

2 / 9

図 2

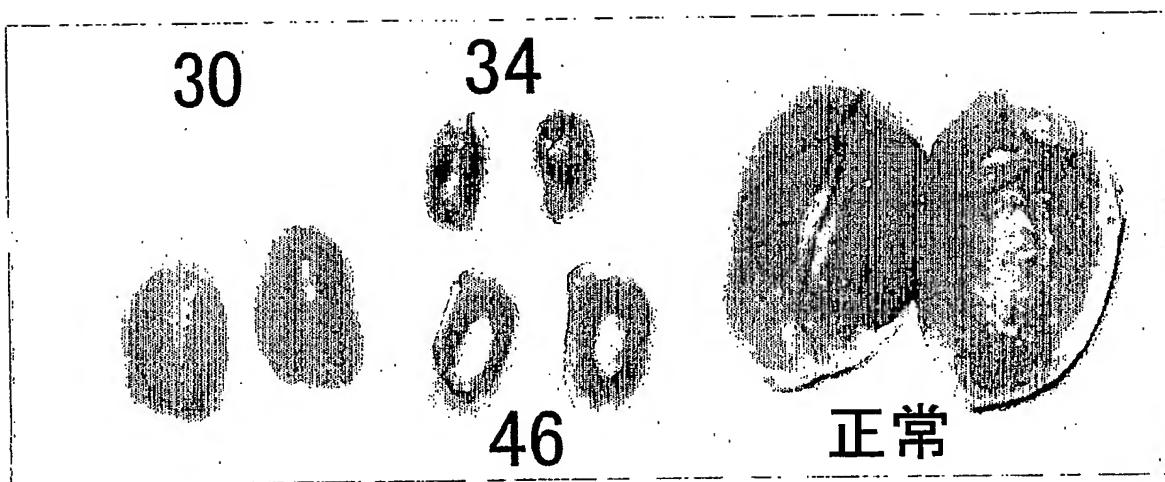
gag cac cga gtc aag aag cgg ccg ccc act tgg cgc cac aac gtt aga	864
Glu His Arg Val Lys Lys Arg Pro Pro Thr Trp Arg His Asn Val Arg	
gcc aag tac aca gag gga gac act gcc acc aaa ggc gac ctg atg cat	912
Ala Lys Tyr Thr Glu Gly Asp Thr Ala Thr Lys Gly Asp Leu Met His	
att caa gag gag ctg atg tac gaa aac gat ttg ctg aaa atg aac att	960
Ile Gln Glu Glu Leu Met Tyr Glu Asn Asp Leu Leu Lys Met Asn Ile	
gag ctg atg cat gcg cac atc aac aag cta aac aat atg ctg cac gac	1008
Glu Leu Met His Ala His Ile Asn Lys Leu Asn Asn Met Leu His Asp	
ctg ata gtc tcc gtg gcc aag gtg gac gag cgt ttg att ggc aat ctc	1056
Leu Ile Val Ser Val Ala Lys Val Asp Glu Arg Leu Ile Gly Asn Leu	
atg aac aac tct gtt tct tca aca ttt ttg tcg gac gac acg ttt ttg	1104
Met Asn Asn Ser Val Ser Ser Thr Phe Leu Ser Asp Asp Thr Phe Leu	
ctg atg ccg tgc acc aat ccg ccg gca cac acc agt aat tgc tac aac	1152
Leu Met Pro Cys Thr Asn Pro Pro Ala His Thr Ser Asn Cys Tyr Asn	
aac agc atc tac aaa gaa ggg cgt tgg gtg gcc aac acg gac tcg tcg	1200
Asn Ser Ile Tyr Lys Glu Gly Arg Trp Val Ala Asn Thr Asp Ser Ser	
caa tgc ata gat ttt agc aac tac aag gaa cta gca att gac gac gac	1248
Gln Cys Ile Asp Phe Ser Asn Tyr Lys Glu Leu Ala Ile Asp Asp Asp	
gtc gag ttt tgg atc ccg acc atc ggc aac acg acc tat cac gac agt	1296
Val Glu Phe Trp Ile Pro Thr Ile Gly Asn Thr Tyr His Asp Ser	
tgg aaa gat gcc agc ggc tgg tcg ttt att gcc caa caa aaa agc aac	1344
Trp Lys Asp Ala Ser Gly Trp Ser Phe Ile Ala Gln Gln Lys Ser Asn	
ctc ata acc acc atg gag aac acc aag ttt ggc ggc gtc ggc acc agt	1392
Leu Ile Thr Thr Met Glu Asn Thr Lys Phe Gly Gly Val Gly Thr Ser	
ctg agc gac atc act tcc atg gct gaa ggc gaa ttg gcc gct aaa ttg	1440
Leu Ser Asp Ile Thr Ser Met Ala Glu Gly Glu Leu Ala Ala Lys Leu	
act tcg ttc atg ttt ggt cat gta gtt aac ttt gta att ata tta att	1488
Thr Ser Phe Met Phe Gly His Val Val Asn Phe Val Ile Ile Leu Ile	
gtg att tta ttt ttg tac tgt atg att aga aac cgt aat aga caa tat	1536
Val Ile Leu Phe Leu Tyr Cys Met Ile Arg Asn Arg Asn Arg Gln Tyr	
配列番号：3 ←	
配列番号：4 ←	
64R1/ 配列番号：2	
EcoRI	
taa gaa ttc	
* Glu Phe	
.....	
	1545

図 3



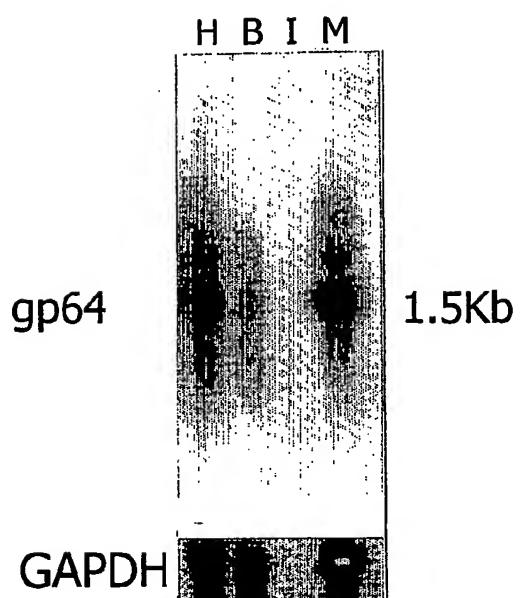
4 / 9

図 4



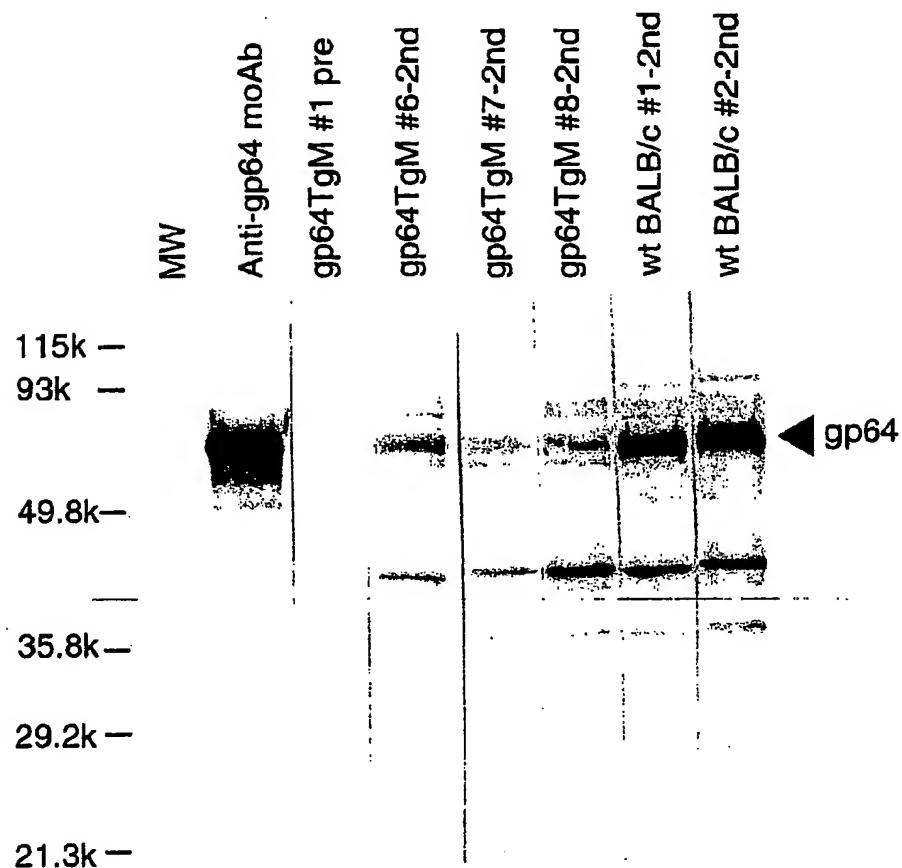
5 / 9

図 5



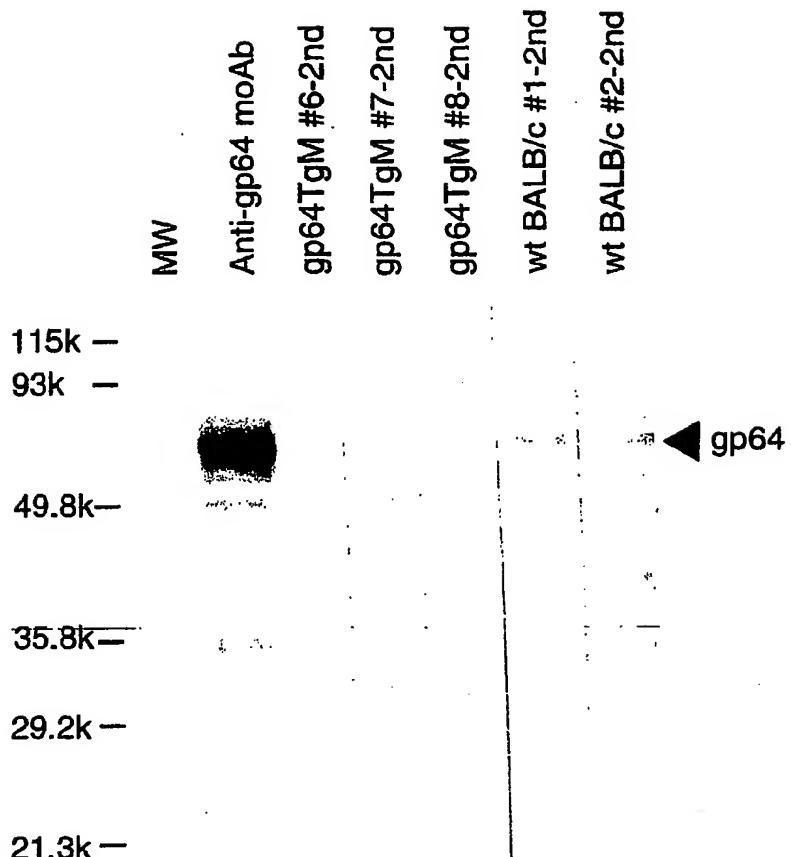
6 / 9

図 6



7 / 9

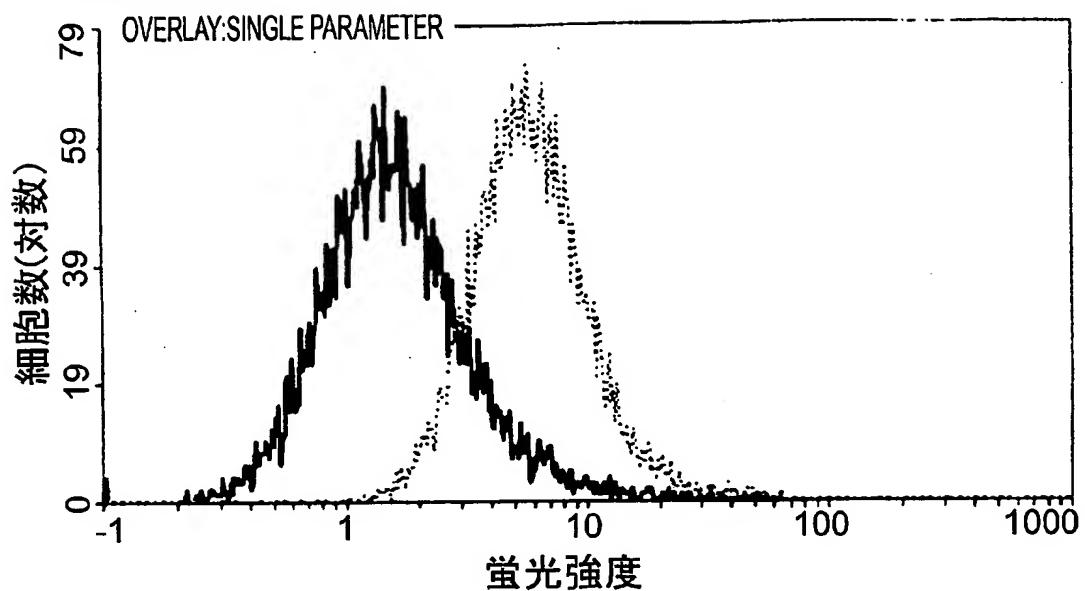
図 7



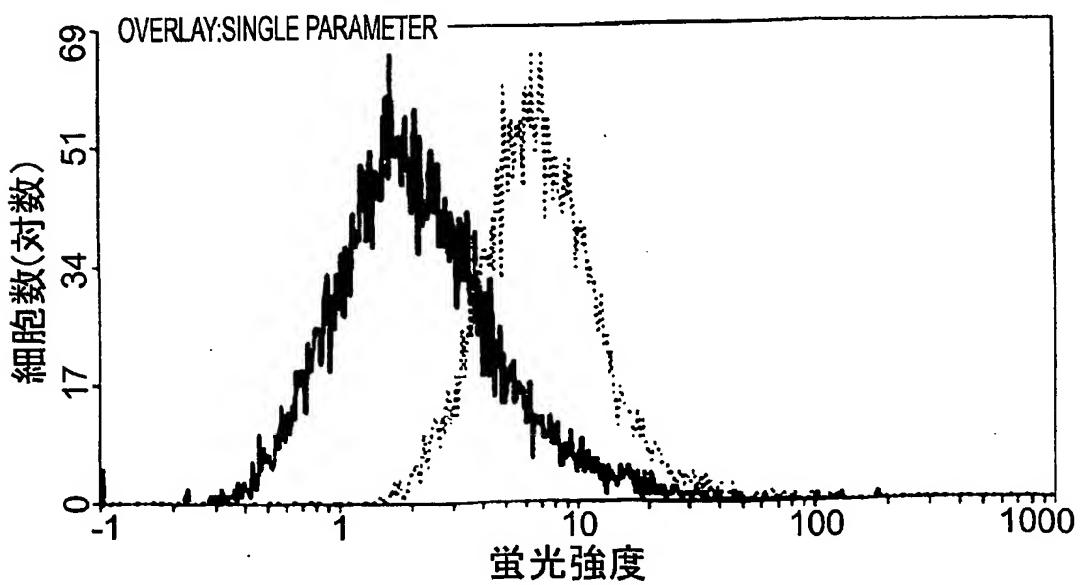
8 / 9

図 8

マウス#1



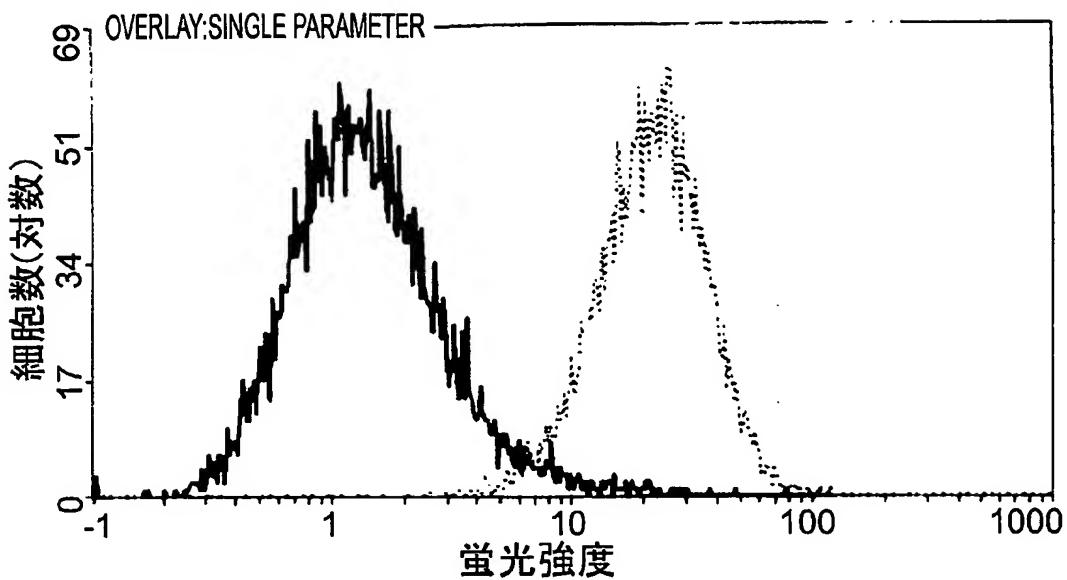
マウス#2



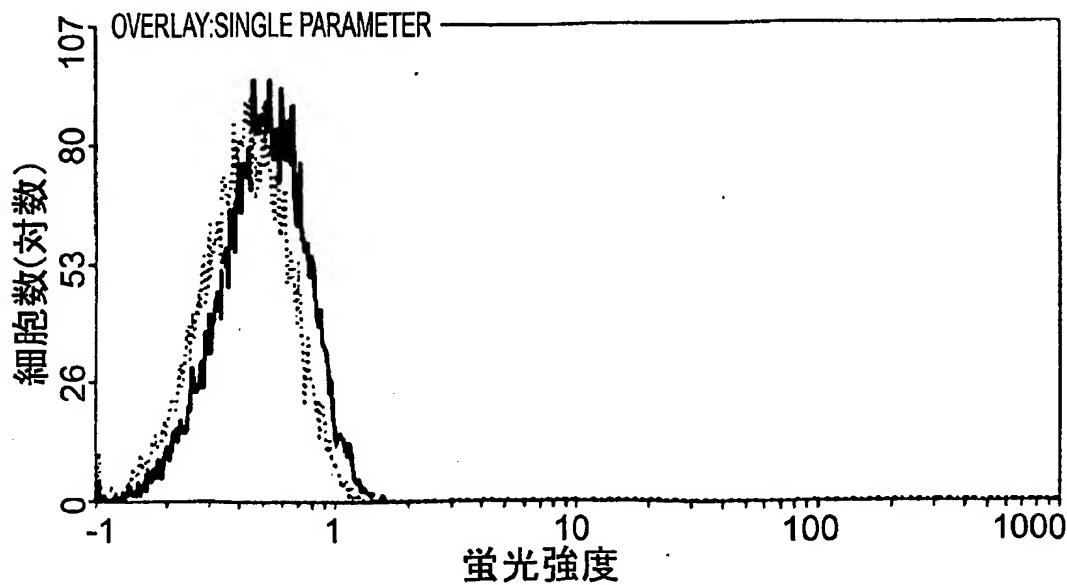
9 / 9

図 9

マウス#3



抗体なし



1 / 1 0

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> A method for producing the antibody

<130> C1-A0210Y1P

<140>

<141>

<150> JP 2002-164834

<151> 2002-06-05

<150> JP 2002-180351

<151> 2002-06-20

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

2 / 1 0

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 1

gaatccacc atggtaagcg ctattgtt

28

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially synthesized primer sequence

<400> 2

gaattcttaa tattgtctat tacggt

26

<210> 3

<211> 1539

<212> DNA

<213> Baculovirus

3 / 1 0

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1539)

<400> 3

atg gta agc gct att gtt tta tat gtg ctt tgg gcg gcg gcg cat 48

Met Val Ser Ala Ile Val Leu Tyr Val Leu Leu Ala Ala Ala Ala His

1

5

10

15

tct gcc tti gcg gcg gag cac tgc aac gcg caa atg aag acg ggt ccg 96

Ser Ala Phe Ala Ala Glu His Cys Asn Ala Gln Met Lys Thr Gly Pro

20

25

30

tac aag att aaa aac ttg gac att acc ccg ccc aag gaa acg ctg caa 144

Tyr Lys Ile Lys Asn Leu Asp Ile Thr Pro Pro Lys Glu Thr Leu Gln

35

40

45

aag gac gtg gaa atc acc atc gtg gag acg gac tac aac gaa aac gtg 192

Lys Asp Val Glu Ile Thr Ile Val Glu Thr Asp Tyr Asn Glu Asn Val

50

55

60

att atc ggc tac aag ggg tac tac cag gcg tat gcg tac aac ggc ggc 240

Ile Ile Gly Tyr Lys Gly Tyr Tyr Gln Ala Tyr Ala Tyr Asn Gly Gly

65

70

75

80

tcg ctg gat ccc aac aca cgc gtc gaa gaa acc atg aaa acg ctg aat 288

4 / 1 0

Ser Leu Asp Pro Asn Thr Arg Val Glu Glu Thr Met Lys Thr Leu Asn

85

90

95

gtg ggc aaa gag gat ttg ctt atg tgg agc atc agg cag cag tgc gag 336

Val Gly Lys Glu Asp Leu Leu Met Trp Ser Ile Arg Gln Gln Cys Glu

100

105

110

gtg ggc gaa gag ctg atc gac cgt tgg ggc agt gac agc gac gac tgt 384

Val Gly Glu Glu Leu Ile Asp Arg Trp Gly Ser Asp Ser Asp Asp Cys

115

120

125

ttt cgc gac aac gag ggc cgc ggc cag tgg gtc aaa ggc aaa gag ttg 432

Phe Arg Asp Asn Glu Gly Arg Gly Gln Trp Val Lys Gly Lys Glu Leu

130

135

140

gtg aag cgg cag aat aac aat cac ttt gcg cac cac acg tgc aac aaa 480

Val Lys Arg Gln Asn Asn Asn His Phe Ala His His Thr Cys Asn Lys

145

150

155

160

tcg tgg cga tgc ggc att tcc act tcg aaa atg tac agc agg ctc gag 528

Ser Trp Arg Cys Gly Ile Ser Thr Ser Lys Met Tyr Ser Arg Leu Glu

165

170

175

tgc cag gac gac acg gac gag tgc cag gta tac att ttg gac gct gag 576

Cys Gln Asp Asp Thr Asp Glu Cys Gln Val Tyr Ile Leu Asp Ala Glu

180

185

190

5 / 10

ggc aac ccc atc aac gtg acc gtg gac act gtg ctt cat cga gac ggc 624

Gly Asn Pro Ile Asn Val Thr Val Asp Thr Val Leu His Arg Asp Gly

195

200

205

gtg agt atg att ctc aaa caa aag tct acg ttc acc acg cgc caa ata 672

Val Ser Met Ile Leu Lys Gln Lys Ser Thr Phe Thr Thr Arg Gln Ile

210

215

220

aaa gct gcg tgt ctg ctc att aaa gat gac aaa aat aac ccc gag tcg 720

Lys Ala Ala Cys Leu Leu Ile Lys Asp Asp Lys Asn Asn Pro Glu Ser

225

230

235

240

gtg aca cgc gaa cac tgc ttg att gac aat gat ata tat gat ctt tct 768

Val Thr Arg Glu His Cys Leu Ile Asp Asn Asp Ile Tyr Asp Leu Ser

245

250

255

aaa aac acg tgg aac tgc aag ttt aac aga tgc att aaa cgc aaa gtc 816

Lys Asn Thr Trp Asn Cys Lys Phe Asn Arg Cys Ile Lys Arg Lys Val

260

265

270

gag cac cga gtc aag aag cgg ccg ccc act tgg cgc cac aac gtt aga 864

Glu His Arg Val Lys Lys Arg Pro Pro Thr Trp Arg His Asn Val Arg

275

280

285

gcc aag tac aca gag gga gac act gcc acc aaa ggc gac ctg atg cat 912

6 / 10

Ala Lys Tyr Thr Glu Gly Asp Thr Ala Thr Lys Gly Asp Leu Met His

290 295 300

att caa gag gag ctg atg tac gaa aac gat ttg ctg aaa atg aac att 960

Ile Gln Glu Glu Leu Met Tyr Glu Asn Asp Leu Leu Lys Met Asn Ile

305 310 315 320

gag ctg atg cat gcg cac atc aac aag cta aac aat atg ctg cac gac 1008

Glu Leu Met His Ala His Ile Asn Lys Leu Asn Asn Met Leu His Asp

325 330 335

ctg ata gtc tcc gtg gcc aag gtg gac gag cgt ttg att ggc aat ctc 1056

Leu Ile Val Ser Val Ala Lys Val Asp Glu Arg Leu Ile Gly Asn Leu

340 345 350

atg aac aac tct gtt tct tca aca ttt ttg tcg gac gac acg ttt ttg 1104

Met Asn Asn Ser Val Ser Ser Thr Phe Leu Ser Asp Asp Thr Phe Leu

355 360 365

ctg atg ccg tgc acc aat ccg ccg gca cac acc agt aat tgc tac aac 1152

Leu Met Pro Cys Thr Asn Pro Pro Ala His Thr Ser Asn Cys Tyr Asn

370 375 380

aac agc atc tac aaa gaa ggg cgt tgg gtg gcc aac acg gac tcg tcg 1200

Asn Ser Ile Tyr Lys Glu Gly Arg Trp Val Ala Asn Thr Asp Ser Ser

385 390 395 400

7 / 10

caa tgc ata gat ttt agc aac tac aag gaa cta gca att gac gac gac 1248

Gln Cys Ile Asp Phe Ser Asn Tyr Lys Glu Leu Ala Ile Asp Asp Asp

405

410

415

gtc gag ttt tgg atc ccg acc atc ggc aac acg acc tat cac gac agt 1296

Val Glu Phe Trp Ile Pro Thr Ile Gly Asn Thr Thr Tyr His Asp Ser

420

425

430

tgg aaa gat gcc agc ggc tgg tcg ttt att gcc caa caa aaa agc aac 1344

Trp Lys Asp Ala Ser Gly Trp Ser Phe Ile Ala Gln Gln Lys Ser Asn

435

440

445

ctc ata acc acc atg gag aac acc aag ttt ggc ggc gtc ggc acc agt 1392

Leu Ile Thr Thr Met Glu Asn Thr Lys Phe Gly Gly Val Gly Thr Ser

450

455

460

ctg agc gac atc act tcc atg gct gaa ggc gaa ttg gcc gct aaa ttg 1440

Leu Ser Asp Ile Thr Ser Met Ala Glu Gly Glu Leu Ala Ala Lys Leu

465

470

475

480

act tcg ttc atg ttt ggt cat gta gtt aac ttt gta att ata tta att 1488

Thr Ser Phe Met Phe Gly His Val Val Asn Phe Val Ile Ile Leu Ile

485

490

495

gtg att tta ttt ttg tac tgt atg att aga aac cgt aat aga caa tat 1536

8 / 10

Val Ile Leu Phe Leu Tyr Cys Met Ile Arg Asn Arg Asn Arg Gln Tyr

500

505

510

taa

1539

<210> 4

<211> 512

<212> PRT

<213> Baculovirus

<400> 4

Met Val Ser Ala Ile Val Leu Tyr Val Leu Leu Ala Ala Ala Ala His

1

5

10

15

Ser Ala Phe Ala Ala Glu His Cys Asn Ala Gln Met Lys Thr Gly Pro

20

25

30

Tyr Lys Ile Lys Asn Leu Asp Ile Thr Pro Pro Lys Glu Thr Leu Gln

35

40

45

Lys Asp Val Glu Ile Thr Ile Val Glu Thr Asp Tyr Asn Glu Asn Val

50

55

60

Ile Ile Gly Tyr Lys Gly Tyr Tyr Gln Ala Tyr Ala Tyr Asn Gly Gly

65

70

75

80

Ser Leu Asp Pro Asn Thr Arg Val Glu Glu Thr Met Lys Thr Leu Asn

85

90

95

Val Gly Lys Glu Asp Leu Leu Met Trp Ser Ile Arg Gln Gln Cys Glu

9 / 10

100 105 110
Val Gly Glu Glu Leu Ile Asp Arg Trp Gly Ser Asp Ser Asp Asp Cys
115 120 125
Phe Arg Asp Asn Glu Gly Arg Gly Gln Trp Val Lys Gly Lys Glu Leu
130 135 140
Val Lys Arg Gln Asn Asn Asn His Phe Ala His His Thr Cys Asn Lys
145 150 155 160
Ser Trp Arg Cys Gly Ile Ser Thr Ser Lys Met Tyr Ser Arg Leu Glu
165 170 175
Cys Gln Asp Asp Thr Asp Glu Cys Gln Val Tyr Ile Leu Asp Ala Glu
180 185 190
Gly Asn Pro Ile Asn Val Thr Val Asp Thr Val Leu His Arg Asp Gly
195 200 205
Val Ser Met Ile Leu Lys Gln Lys Ser Thr Phe Thr Thr Arg Gln Ile
210 215 220
Lys Ala Ala Cys Leu Leu Ile Lys Asp Asp Lys Asn Asn Pro Glu Ser
225 230 235 240
Val Thr Arg Glu His Cys Leu Ile Asp Asn Asp Ile Tyr Asp Leu Ser
245 250 255
Lys Asn Thr Trp Asn Cys Lys Phe Asn Arg Cys Ile Lys Arg Lys Val
260 265 270
Glu His Arg Val Lys Lys Arg Pro Pro Thr Trp Arg His Asn Val Arg
275 280 285
Ala Lys Tyr Thr Glu Gly Asp Thr Ala Thr Lys Gly Asp Leu Met His
290 295 300
Ile Gln Glu Glu Leu Met Tyr Glu Asn Asp Leu Leu Lys Met Asn Ile

10 / 10

305 310 315 320
Glu Leu Met His Ala His Ile Asn Lys Leu Asn Asn Met Leu His Asp
325 330 335
Leu Ile Val Ser Val Ala Lys Val Asp Glu Arg Leu Ile Gly Asn Leu
340 345 350
Met Asn Asn Ser Val Ser Ser Thr Phe Leu Ser Asp Asp Thr Phe Leu
355 360 365
Leu Met Pro Cys Thr Asn Pro Pro Ala His Thr Ser Asn Cys Tyr Asn
370 375 380
Asn Ser Ile Tyr Lys Glu Gly Arg Trp Val Ala Asn Thr Asp Ser Ser
385 390 395 400
Gln Cys Ile Asp Phe Ser Asn Tyr Lys Glu Leu Ala Ile Asp Asp Asp
405 410 415
Val Glu Phe Trp Ile Pro Thr Ile Gly Asn Thr Thr Tyr His Asp Ser
420 425 430
Trp Lys Asp Ala Ser Gly Trp Ser Phe Ile Ala Gln Gln Lys Ser Asn
435 440 445
Leu Ile Thr Thr Met Glu Asn Thr Lys Phe Gly Gly Val Gly Thr Ser
450 455 460
Leu Ser Asp Ile Thr Ser Met Ala Glu Gly Glu Leu Ala Ala Lys Leu
465 470 475 480
Thr Ser Phe Met Phe Gly His Val Val Asn Phe Val Ile Ile Leu Ile
485 490 495
Val Ile Leu Phe Leu Tyr Cys Met Ile Arg Asn Arg Asn Arg Gln Tyr
500 505 510

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07071

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N5/16, C07K16/08, A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N5/16, C07K16/08, A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN), JSTPlus (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Satoi J. et al., Genetic immunization of wild-type and hepatitis C virus transgenic mice reveals a hierarchy of cellular immune response and tolerance induction against hepatitis C virus structural proteins., J.Virol., (2001), Vol.75, No.24, pages 12121 to 12127	<u>12,15,16</u> 1-11,13,14, 17-19
X A	Blissard GW. et al., Location, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the Orgyia pseudotsugata multicapsid nuclear polyhedrosis virus., Virology., (1989), Vol.170, No.2, pages 537 to 555	<u>12-18</u> 1-11,19

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

"A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search 08 July, 2003 (08.07.03)	Date of mailing of the international search report 22 July, 2003 (22.07.03)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07071

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Liang R. et al., Human intestinal H+/peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localization., J.Biol.Chem., (1995), Vol.270, No.12, pages 6456 to 6463	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07071

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The matter common to claims 1 to 19 resides in a transgenic nonhuman animal having a gene encoding a virus-origin membrane protein transferred therein.

However, a transgenic mouse having a gene encoding a virus-origin membrane protein transferred therein was already publicly known on the priority date of the present case (Satoi J., et al., J. Virol. (2001), Vol.75, No.24, p.12121-12127). Therefore, this common matter falls within the category of prior art and thus cannot be considered as a special technical matter in the meaning as described in PCT Rule 13.2.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12N15/09, C12N5/16, C07K16/08, A01K67/027

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl' C12N15/09, C12N5/16, C07K16/08, A01K67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPIDS/MEDLINE(STN), JSTPlus(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	Sato J, et.al., Genetic immunization of wild-type and hepatitis C virus transgenic mice reveals a hierarchy of cellular immune response and tolerance induction against hepatitis C virus structural proteins., J Virol. (2001), Vol. 75, No. 24, p. 12121-12127	<u>12, 15, 16</u> 1-11, 13, 14, 17-19
X A	Blissard GW, et.al., Location, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the Orgyia pseudotsugata multicapsid nuclear polyhedrosis virus., Virology. (1989), Vol. 170, No. 2, p. 537-555	<u>12-18</u> 1-11, 19

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.07.03

国際調査報告の発送日

22.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

鈴木 美葉子

(印)

4 N 9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C(続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	Liang R, et. al., Human intestinal H ⁺ /peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localization., J Biol Chem. (1995), Vol. 270, No. 12, p. 6456-6463	1-19

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-19に共通の事項は、ウイルス由来膜蛋白質をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニック非ヒト動物である。

しかしながら、本願優先日当時、ウイルス由来膜蛋白質をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニックマウスは公知であったことから（Satoi J, et.al., J Virol. (2001), Vol. 75, No. 24, p. 12121-12127）、この共通事項は先行技術の域をぐるものではないから、PCT規則13.2における特別な技術事項であるとはいえない。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

DESCRIPTION
METHODS FOR PRODUCING ANTIBODIES

Technical Field

5 This invention relates to methods for producing antibodies. This invention also relates to the antibodies obtained by the methods of this invention. This invention further relates to transgenic non-human animals useful for the production of antibodies generated by the methods of this invention.

10

Background Art

Antibodies are useful as therapeutic agents, diagnostic agents, or reagents for various diseases. Many kinds of antibodies have been isolated to date. General methods for producing antibodies comprise 15 the steps of administering antigens to mammals such as mice; and obtaining antibodies derived from the serum of these animals. However, subject antibodies are not always obtained efficiently by antibody production methods, as in the following cases, for example:
■ when a small quantity of antigen is used to immunize mammals; or
20 ■ when an insufficiently purified antigen is used to immunize mammals.

Therefore, when immunizing, it is desirable to prepare a large quantity of a sufficiently purified antigen. Practically, however, many antigens are difficult to purify or to sufficiently prepare. Thus, the step of antigen preparation has often prevented antibody 25 production.

Membrane proteins are one example of antigens for which immunogens are difficult to prepare. Generally, membrane proteins are often difficult to highly express or sufficiently purify. These difficulties have been an obstacle in obtaining antibodies against 30 membrane proteins.

Attention has been paid to methods that use baculoviruses to express large quantities of membrane proteins. By introducing a gene that encodes a subject membrane protein into a baculovirus genome, the subject membrane protein is expressed on the membrane surface 35 of the budding baculovirus (WO 98/46777, Unexamined Published Japanese Patent Application No. (JP-A) 2001-333773). Using these

methods enables expression of a large quantity of a subject membrane protein on a viral membrane surface.

However, in addition to exogenous membrane proteins, baculovirus-derived membrane proteins are also expressed on the membrane surface of the baculoviruses thus obtained. Thus, when budding baculoviruses are used as antigens, antibodies against baculovirus-derived membrane proteins may also be produced. Accordingly, it has been difficult to efficiently produce antibodies against subject membrane proteins by using known immunization methods.

For example, immunization using budding baculoviruses as antigens often induces antibodies that recognize gp64. The membrane proteins of baculoviruses comprise large quantities of gp64. In addition, due to gp64's high antigenicity, immunized animals can easily recognize gp64 as "nonself". Consequently, budding baculoviruses can be thought to preferentially induce anti-gp64 antibodies.

Therefore, when using membrane proteins as antigens, the subject membrane proteins expressed on the baculovirus membrane surface must be sufficiently purified. However, purifying exogenous membrane proteins from budding baculoviruses is generally difficult. Thus, it can be said that sufficient quantities of highly purified membrane proteins cannot be practically obtained for use in immunization. Using conventional methods to obtain target antibodies for these difficult-to-purify antigens has been difficult.

Disclosure of the Invention

An objective of the present invention is to solve the above-described problems. In other words, an objective of this invention is to provide methods for producing antibodies that enable target antibodies to be easily obtained. In addition, an objective of this invention is to provide transgenic non-human animals that efficiently produce subject antibodies.

To solve the above-described problems, the inventors focused on antigens that are comprised in immunogens and that interfere with the production of subject antibodies. Then, the inventors thought

that a subject antibody could be easily obtained by using immunized animals whose immune response to such interfering antigens is repressed. Furthermore, the inventors found that the above-described problems can be solved by utilizing immunotolerance 5 to the antigens that interfere with production of the subject antibodies, to control the immune responses of the immunized animals, and thereby complete the present invention.

Specifically, the present invention relates to methods for producing antibodies, transgenic non-human animals useful for these 10 methods, and methods for producing these non-human animals. Specifically, the present invention provides the following:

[1] A method for producing an antibody that recognizes a target antigen, wherein the method comprises the steps of:

i) immunizing a non-human animal that has immunotolerance to a 15 background antigen comprised in an immunogen, wherein the immunogen comprises both the target antigen and the background antigen; and ii) obtaining an antibody against the target antigen, or a gene encoding the antibody.

[2] The method of [1], wherein immunotolerance is induced 20 artificially.

[3] The method of [1], wherein the non-human animal is a transgenic non-human animal.

[4] A method for producing an antibody against a target antigen, wherein the method comprises the steps of:

25 (a) preparing an immunogen comprising the target antigen and a background antigen;
(b) producing a transgenic non-human animal comprising a gene expressibly encoding the background antigen;
(c) administering the immunogen of (a) to the transgenic non-human 30 animal of (b); and
(d) isolating the antibody against the target antigen from the transgenic non-human animal.

[5] The method of [4], wherein the immunogen is a virus particle or a part thereof.

35 [6] The method of [5], wherein the virus is a baculovirus.

[7] The method of [4], wherein the target antigen is a membrane

protein.

[8] The method of [6], wherein the background antigen is gp64.

[9] The method of [4], wherein the non-human animal is a mouse.

[10] An antibody that is produced by the method of any one of

5 [1] to [9].

[11] A chimeric antibody between a non-human animal and human, or a humanized antibody, produced using the antibody of [10].

[12] A transgenic non-human animal, into which a gene encoding a viral envelope protein is introduced.

10 [13] The transgenic non-human animal of [12], wherein the virus is a baculovirus.

[14] The non-human animal of [13], wherein the viral envelope protein is gp64.

15 [15] The non-human animal of [12], wherein the non-human animal is a mouse.

[16] The non-human animal of [12] for use in producing an antibody against an antigen comprising a viral protein.

20 [17] A method for producing a non-human immunized animal, wherein the method comprises the step of producing a transgenic non-human animal into which a gene encoding a background antigen is introduced.

[18] A non-human immunized animal for obtaining an antibody against a target antigen comprising a background antigen, wherein the animal is produced by the method of [17].

25 [19] A method for producing an antibody against PepT1, wherein the method comprises the steps of:

(a) preparing a baculovirus that expressibly comprises a DNA which encodes PepT1 or a fragment thereof;

30 (b) infecting a host cell with the baculovirus of (a) to obtain a budding virus that expresses PepT1 or a fragment thereof;

(c) producing a transgenic non-human animal that expressibly comprises a gene encoding a baculovirus membrane protein gp64;

(d) immunizing the transgenic non-human animal of (c) with a fraction comprising the budding virus of (b) or PepT1 or its fragment; and

35 (e) recovering the antibody-recognizing PepT1 from the immunized animal.

This invention relates to methods for producing antibodies which recognize target antigens, wherein the methods comprise the step of immunizing immunogens that comprise a target antigen and a 5 background antigen, to non-human animals with immunotolerance to the background antigen comprised in the immunogen.

The term "target antigen" denotes antigens recognized by subject antibodies. The target antigens can be selected from any compound comprising antigenicity. Specifically, proteins, sugar 10 chains, lipids, or inorganic substances are known to comprise antigenicity. The target antigens may be naturally occurring or artificially synthesized. The artificially synthesized target antigens comprise recombinant proteins prepared by genetic engineering technology, and many kinds of chemically-synthesized 15 organic compounds.

According to the present invention, the term "background antigen" denotes substances comprising antigenic determinants for which antibody generation is not desired, or denotes the antigenic determinants themselves. For example, any antigenic substance that 20 is not a target antigen, but which is contaminated within the target antigen, is a background antigen. Typical background antigens are proteins contaminated within crudely purified target antigens. More specifically, host cell-derived proteins in a recombinant protein 25 are examples of background antigens. The term "background antigen" may also be defined to mean antigens that are comprised within an immunogen for inducing subject antibody generation, and that induce production of a non-subject antibody.

Generally, a background antigen is an antigenic substance other than a target antigen. According to the present invention, however, 30 antigenic determinants present on target antigen molecules may also be referred to as background antigens. For example, if an antigenic determinant for which antibody generation is undesired is present on a target antigen molecule, the antigenic determinant is defined as a background antigen. Moreover, the background antigens of the 35 present invention include substances that comprise antigenic determinants as background antigens, yet do not comprise target

antigens.

According to the present invention, preferable background antigens are proteins, peptides, sugars, or glycoproteins. Of these, proteins or peptides are particularly preferable background antigens.

- 5 The term "peptide" denotes, for example, polypeptides that consist of 100 or fewer amino acid residues. The term "protein" includes "peptide".

According to the present invention, the term "immunotolerance" denotes a condition in which an immune response, specific to an antigen
10 that is an immunotolerance target (an immunotolerance antigen), is lost or decreased. When the level of a subject's immune response to an immunotolerance antigen is reduced compared to that of a normal immunized animal, the subject can be regarded to comprise immunotolerance against the immunotolerance antigen. For example,
15 when the amount of an antibody generated against an immunotolerance antigen is decreased in response to the administration of an immunotolerance antigen, the level of immune response is then considered to be low. Immunotolerance levels are not limited.

In addition, the term "immunotolerance antigen" denotes
20 antigenic substances for which a subject's immune response is decreased. Also, according to the present invention, a reduced level of a specific immune response to an immunotolerance antigen denotes that the degree by which the immune response to the immunotolerance antigen has decreased is greater than for other antigens. Thus, even
25 if the immune response to antigens other than the immunotolerance antigen is decreased, immunotolerance has been established if the level of decrease in immune response to other antigens is less than the level of decrease for the immunotolerance antigen. Also,
30 according to the present invention, immunotolerance includes cases of immunotolerance to antigenic substances other than background antigens. Subjects which are immunotolerant to multiple antigens may also be used in the present invention, as long as they have an immune response to a target antigen. On the other hand, cases of immunodeficiency where the level of actual immune response is
35 decreased are not preferable, since generation of antibodies against target antigens cannot be expected.

In the present invention, non-human animals that comprise immunotolerance to a background antigen are used as immunized animals. Non-human animals comprising artificially induced immunotolerance are preferably used. For example, non-human animals comprising immunotolerance can be generated as below:

First, a gene encoding a background antigen can be introduced into a non-human animal to generate a transgenic animal that comprises the gene encoding the background antigen. Transgenic animals thus obtained have immunotolerance to the expression product of the introduced gene (the background antigen). Immunotolerance can also be induced by multiple administrations of an immunotolerance antigen (a background antigen) to non-human animals in the fetal stage or shortly after birth.

Methods for administering antigens as immunotolerance antigens to non-human animals in the fetal stage or shortly after birth can include methods for administering the antigenic substances themselves into non-human animals. Alternatively, indirect methods for administering immunotolerance antigens may also be applied. For example, subject immunotolerance antigens are administered by *in vivo* expression of genes that encode the immunotolerance antigens. Such methods include methods for directly administering an antigen-coding DNA (naked DNA methods), for transplanting antigen-expressing cells into non-human animals, methods using viral vectors, and methods using DNA vaccines.

Of these methods, transgenic non-human animals which preserve a gene encoding an immunotolerance antigen in an expressible state are preferred as the non-human animals comprising immunotolerance of the present invention. The transgenic animals comprise in their body an immunotolerance antigen that was originally an exogenous protein prior to the maturation of immune functions. Therefore, it is highly possible that the immune functions of the transgenic animals recognize the immunotolerance antigen as being completely endogenous. Thus, the use of such transgenic non-human animals is advantageous in inducing immunotolerance in the present invention. The transgenic animals, into which immunotolerance antigens are introduced, produce few antibodies to immunotolerance antigens, as shown in Examples.

In addition, the immunotolerant traits of the transgenic animals can be inherited by their progeny. Therefore, once a transgenic non-human animal has been established for the present invention, immunized animals comprising the same traits can be stably provided.

This invention also relates to transgenic non-human animals into which genes encoding a viral envelope protein are introduced to produce antibodies against antigens comprising the viral proteins. Moreover, this invention relates to use of transgenic non-human animals in which a gene encoding the viral envelope protein is expressibly maintained, as immunized animals for producing antibodies against antigens comprising viral envelope proteins. Furthermore, this invention relates to methods for producing non-human immunized animals, where the methods comprise the step of generating a transgenic non-human animal into which a gene encoding a background antigen has been introduced.

Many kinds of transgenic non-human animals into which different kinds of genes have been introduced are known in the art. However, animals into which an exogenous gene encoding a background antigen has been introduced are not known to be useful as immune animals for a target antigen that comprises a background antigen.

Since an animal in which a gene that encodes a target antigen protein has been deleted, (so called knock-out animals), does not comprise the target antigen protein congenitally, an antibody against the target antigen can be obtained by administering the target antigen to the knock-out animal, even if the target antigen is highly homologous to a protein present in the immunized animal. Moreover, it is possible to obtain an animal which is deficient in a target antigen, and which expresses an immunotolerant antigen, by crossing the target antigen-deficient animal with the transgenic animal of the present invention.

Genes coding for background antigens can also be introduced into a fetal or post-fetal non-human animal in a fetal period or thereafter, by using naked DNA methods, DNA vaccine methods, or methods for transplanting cells that express background antigens. Non-human animals thus obtained are also included in the transgenic non-human

animals of the present invention.

There is no limitation as to the number of background antigens used to induce immunotolerance in the immunotolerant non-human animals of the present invention. That is, a non-human animal, in which immunotolerance to at least one background antigen has been induced, can be used in an antibody-production method of the present invention. Non-human animals in which immunotolerance to multiple background antigens has been induced can also be used as immunized animals.

In the immunized animals, it is not always important to suppress production of antibodies against all of the background antigens that might be comprised in an immunogen. Production of antibodies that recognize background antigens is acceptable as long as they do not interfere with the production and isolation of an antibody against a target antigen. Therefore, for example, an immunized animal in which immunotolerance has only been induced to a major background antigen can be used as a preferable immunized animal in the present invention.

In the present invention, non-human animals comprise, for example, monkeys, pigs, dogs, rats, mice, and rabbits. For example, rodents such as rats, mice, and hamsters are preferable as non-human animals. To induce immunotolerance by preparing transgenic animals, it is advantageous to use non-human animals which mature fast and for which gene manipulation technologies have been established, such as rodents. Mice in particular are non-human animals that meet these requirements at a high level.

This invention relates to transgenic non-human animals into which genes coding for viral envelope proteins have been introduced. Transgenic non-human animals of the present invention are useful in immunization against a target antigen in the presence of viral envelope proteins. Typically, viral envelope proteins in this invention are proteins that make up an envelope of a budding virus. In baculoviruses, for example, the protein called gp64 is an envelope protein.

For example, a transgenic non-human animal with immunotolerance to the baculoviral gp64 is useful as an immune animal for an immunogen

produced by the baculovirus expression system. Many kinds of proteins can be produced by the baculovirus expression system. Therefore, by using these transgenic animals and baculovirus expression systems in combination, target antibodies can be easily obtained by using a variety of protein antigens as target antigens.

5 Immunogens of the present invention comprise both target antigens and background antigens. As described above, there is no particular limitation as to the substances constituting target antigens or background antigens. When an animal with immunotolerance is produced by introduction of a gene encoding a background antigen, the background antigen is a protein. Immunogens may include substances other than target antigens and background antigens.

10 Furthermore, there is no limitation as to the types of background antigens that comprise the immunogens of the present invention. Therefore, immunogens comprising multiple kinds of background antigens, which may interfere with the production of antibodies against a target antigen, can also be used in the present invention. The presence of these background antigens is not a problem, as long as an immunized animal shows immunotolerance to each 15 background antigen. Alternatively, background antigens which do not substantially interfere with the production of antibodies against a target antigen may be comprised in an immunogen, regardless of whether or not an immunized animal is immunotolerant to them.

20 Generally, a target antigen comprises substances derived from biological materials. Biological materials are complex mixtures comprising various components. Thus, target antigens are usually prepared using various mixtures as starting materials. Therefore, it is difficult to obtain highly-purified target antigens. In other words, it involves a lot of time and effort to isolate a large quantity 25 of a highly pure target antigen. Practically, it is almost inevitable that an immunogen contains substances other than the target antigen.

30 Immunogens of the present invention specifically include cells, cell cultures, cell lysates, viruses, or unpurified antigens. Parts of cells or viruses can be used as immunogens, as well as whole cells or whole viruses. For example, cell membranes or virus envelopes can 35 be used as immunogens. When a cell or virus is used as an immunogen,

a gene coding for a subject antigen can be artificially introduced into the cell or virus by recombinant gene technology that artificially expresses the subject antigen.

One preferable immunogen of the present invention is a viral particle or part thereof. Viruses are comprised of relatively simple components, including nucleic acids, and limited proteins, saccharides, and such. Consequently, the types of background antigens that may interfere with target antigen isolation are also limited. In sum, inducing immunotolerance against a limited number of background antigens in an animal to be immunized would be enough to carry out a method for producing antigen of the present invention.

In the present invention, baculoviruses, for example, are preferred among the viruses that can be used as immunogens. Baculoviruses are insect viruses that comprise a structure whereby a double-stranded DNA genome is covered with a capsid protein. Expression systems using Nucleopolyhedrovirus (NPV), a type of baculovirus, are useful as systems for expressing exogenous genes. NPV comprises strong promoter activity. Therefore, any protein can be produced in large quantities by inserting an exogenous gene into the NPV genome. Specifically, strong expression of any exogenous gene is induced by recombinantly substituting the gene coding for the protein called polyhedron with the exogenous gene.

Any exogenous genes can be introduced into a baculovirus. For example, a gene encoding a membrane protein can be used as an exogenous gene.

By using baculoviruses, a subject membrane protein can be expressed along with a viral envelope protein in a form that retains that structure. Another big advantage of the baculovirus expression system is that the expressed products are easily recovered as budding viral particles.

Membrane proteins include many biologically important molecules, such as receptors and transporters. However, many membrane proteins maintain their structure by being located in a cell membrane. In addition, membrane proteins are often post-translationally modified with sugar chains or lipids. Therefore, there are often cases where expression systems utilizing

prokaryotes such as *E.coli* cannot reproduce membrane proteins in their *in situ* structure.

As methods for expressing exogenous proteins such as membrane proteins on viral envelopes, for example, the method of WO98/46777 or Loisel et al. for expressing envelope proteins using budding baculoviruses can be used (Loisel, T.P. et al., Nature Biotech. 15: 1300-1304 (1997)). More specifically, a recombinant vector for insect cells comprising a gene encoding an exogenous protein is constructed, and inserted, along with baculoviral DNA, into insect cells such as Sf9. The exogenous protein encoded by the recombinant vector is then expressed on mature viral particles (virions), which are released by infected cells to the outside of cells prior to infected cell death. Recombinant viruses that express the exogenous protein can thus be obtained.

In the present invention, a budding virus is a virus that is released from infected cells by budding. Generally, viruses covered with an envelope can bud from cells infected with these viruses, and are released continuously, even when the cells have not been destroyed. On the other hand, adenoviruses that are not covered by an envelope, and herpes viruses that are covered by a nuclear envelope, are released from the cells all at once, upon cell destruction. Budding viruses are particularly preferable in the present invention. In addition, those skilled in the art can suitably select hosts to be infected with a recombinant virus, depending on the type of virus used, so long as viral replication is possible in the host. For example, insect Sf9 cells can be used when using baculoviruses. Generally, protein expression systems using baculoviruses and insect cells can be useful because modifications such as fatty acid acetylation or glycosylation are carried out at the same time as translation or post-translation, in the same way as in mammalian cells. In addition, the expression level of heterologous proteins in such systems is greater than that in mammalian cell systems (Luckow V.A. and Summers M.D., Virol. 167: 56 (1988)).

The viruses expressing exogenous proteins can be obtained by, for example, culturing a host that has been infected with a recombinant virus comprising a gene that encodes an exogenous protein.

Alternatively, using methods such as the above-mentioned methods of WO 98/46777 and Loisel et al (Loisel, T.P. et al., Nature Biotech. 15: 1300-1304 (1997)), a recombinant vector encoding an exogenous protein can be inserted into an insect cell along with a baculovirus, 5 and exogenous proteins can be expressed on the envelope of the baculovirus released outside of the cell. In addition, using methods like that of Strehlow et al. (D. Strehlow et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97: 4209-4214 (2000)), packaging cells such as PA317 can be infected with recombinant Moloney murine leukemia viruses, which 10 are constructed using vectors derived from Moloney viruses introduced with exogenous protein-encoding genes, and the exogenous proteins can be expressed on the envelope of viruses released outside of the cells. However, the viruses of the present invention that express exogenous proteins, useful as immunogens, are not limited to those 15 that are constructed using the above methods.

Recombinant viruses constructed as described above can be purified using known methods. For example, known methods for purifying viruses include augmented density gradient centrifugation (Albrechtsen et al., J. Virological Methods 28: 245-256 (1990); Hewish et al., J. Virological Methods 7: 223-228 (1983)), size exclusion chromatography (Hjorth and Mereno-Lopez, J. Virological Methods 5: 151-158 (1982); Crooks et al., J. Chrom. 502: 59-68 (1990); Mento S.J. (Viagene, Inc.) 1994 Williamsburg Bioprocessing Conference), affinity chromatography using monoclonal antibodies, sulphated 25 fucose-containing polysaccharides and the like (Najayou et al., J. Virological Methods 32: 67-77 (1991); Diaco et al., J. Gen. Virol. 67: 345-351 (1986); Fowler, J. Virological Methods 11: 59-74 (1986); TOKUSAIHYOU No. 97/032010 (Unexamined Publication of Japanese National Phase Patent Application)), and DEAE ion exchange 30 chromatography (Haruna et al., Virology 13: 264-267 (1961)). Thus, purification can be carried out using the above methods or combinations thereof.

In the present invention, there is no limitation as to the kind of background antigen which becomes an immunotolerance antigen for 35 use as an antigen to induce immunotolerance in immune animals. Preferably, the immunotolerance antigens are such substances that

are comprised in an immunogen in a large quantity, or that have a strong antigenicity. For example, when a baculovirus is used as an immunogen, gp64 is preferably used as an immunotolerance antigen. Gp64 is a major background antigen, which is expressed in large 5 quantities on the surface of the viral envelope, and which is susceptible to being recognized as non-self by animals immunized with baculoviruses.

Baculoviruses comprise characteristics that are preferable in an expression system for exogenous proteins. On the other hand, use 10 of an expression product produced by this system as an immunogen, it is accompanied by production of background antigens, which can be a drawback. In particular, when using a baculovirus expression system to produce a membrane protein that is used as an immunogen, the presence of gp64 is a big problem. gp64 is comprised in large 15 amounts in viral envelope proteins. Thus, contamination of an exogenous membrane protein with gp64 is inevitable.

By using the antibody-production methods of the present invention, the inhibitory effect that background antigens have on the acquisition of antibodies against a target antigen can be 20 suppressed. Consequently, the use of this invention enables sufficient application of the advantages of a baculovirus expression system as an exogenous protein expression system, even in the preparation of immunogens.

In the present invention, naturally occurring viruses or parts 25 thereof can also be used as immunogens. Development of an antibody that recognizes a specific antigenic determinant of a naturally occurring virus is important to the specific detection of the virus, and also to prevention of or therapy for infection by that virus. Whereas antibodies against major antigens can be easily produced, 30 it is often difficult to acquire an antibody that recognizes a specific antigenic determinant. This situation is common to the above described case in which a baculovirus expression product is used as an immunogen.

When using a naturally occurring virus as an immunogen of the 35 present invention, a gene coding for a protein that will act as a background antigen, selected from proteins that constitute the virus,

is introduced into a non-human animal to prepare a transgenic animal. Alternatively, viral particles themselves, or parts thereof that comprise a target antigen, are used as immunogens. In this way, an antibody that recognizes a target antigen can be efficiently obtained.

5 For example, the surface antigens of influenza viruses are important antigens that determine the viral strain. If antibodies that recognized the surface antigens specific to each influenza virus strain could be easily obtained, this would be useful to identification of the virus, as well as in the prevention of or therapy
10 for infection by the virus. However, when using the viral particles themselves as immunogens, antibodies that recognize structures common to the viruses will also be produced in large quantities.

15 Antibodies that recognize surface antigens specific to each viral strain can be efficiently obtained by using a transgenic non-human animal of the present invention, which has immunotolerance to an envelope protein that is common to the influenza viruses. In other words, this invention can be also carried out using surface antigens that are specific to each strain of a virus as target antigens, and using structures that are common to the viruses as background
20 antigens.

A preferable embodiment of the antibody-production methods of the present invention is described below. In this embodiment, membrane proteins are used as target antigens. For example, human-derived membrane proteins can be used as the membrane proteins.

25 First of all, a target protein is expressed on the surface of the baculovirus envelope, and this baculovirus is used as an immunogen. As a method for expression the membrane protein using baculoviruses, for example, the methods for expressing membrane proteins using budding baculoviruses, disclosed in WO 98/46777, JP-A 2001-333773,
30 Loisel et al. (T. P. Loisel et al., Nature Biotech. 15: 1300-1304 (1997)), can be used.

In more detail, a recombinant vector for insect cells is constructed to comprise a gene encoding a membrane protein. This vector is then introduced into insect cells along with the baculovirus
35 DNA. Sf9 cells and such are used as the insect cells. The membrane protein encoded by the recombinant vector is expressed in mature viral

particles (virions) released extracellularly from the infected cells prior to cell death. Therefore, budding baculovirus particles that express the membrane protein (target antigen) may be obtained by harvesting mature virus particles. Methods for recovering budding baculovirus from cultured cells are also known in the art. The thus obtained budding baculoviruses that express a membrane protein (target antigen) are used as immunogens of the present invention.

As described above, the surface of the baculovirus envelope expresses not only a membrane protein (the target antigen), but also another envelope protein derived from a baculovirus. In particular, gp64 is expressed in large quantities on the surface of baculoviruses, and also has strong antigenicity. Therefore, when immunization is carried out using a budding baculovirus, anti-gp64 antibodies are also produced, and thus antibodies to the membrane protein (target antigen) cannot be efficiently obtained.

Accordingly, in the present invention, an animal that expresses gp64 is used as an animal to be immunized. Specifically, a transgenic animal that expresses gp64 is produced by introducing a vector that comprises a gene encoding gp64 into an animal. The transgenic animals of the present invention are non-human animals. For example, a transgenic mouse into which the gp64 gene has been introduced can be used as an animal to be immunized in the present invention.

In the present invention, these transgenic mice are immunized with the budding baculovirus particles obtained as described above. Since the gp64-expressing transgenic mice endogenously express gp64, they comprise immunotolerance to gp64, which acts as a background antigen. In other words, production of anti-gp64 antibodies in the gp64-expressing transgenic mice is suppressed when the mice are immunized with the budding baculovirus particles. As a result, antibodies against a target membrane protein can be produced efficiently.

Methods for producing transgenic mice are known in the art. For example, transgenic mice can be obtained according to the methods described in Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7380-7384 (1980). Specifically, subject genes are introduced into mammalian totipotent cells, and then the cells are brought up into individuals. A subject

transgenic mouse can be obtained from the individuals thus obtained by screening for individuals in which the introduced gene has been integrated into both somatic cells and germ cells. Fertilized eggs, early embryos, and cultured cells with multipotency such as ES cells, 5 and such, can be used as the totipotent cells for introducing a gene.

More specifically, transgenic mice can be prepared, for example, by the method in Examples.

The antibody-production methods of the present invention can be used to produce polyclonal and monoclonal antibodies. Polyclonal 10 antibodies can be obtained by recovering antibodies to the target antigen from an immunized animal. Alternatively, monoclonal antibody-producing cells can be obtained by cloning an antibody-producing cell derived from an immunized animal.

Furthermore, by using antibodies or genes thereof obtained from 15 an immunized animal such as mice, chimeric antibodies of human and immunized animals, or humanized antibodies can be obtained. Methods for producing these antibodies that comprise modified structures are also known in the art.

Furthermore, this invention relates to the antibodies obtained 20 by the methods of the present invention. The antibodies of the present invention comprise any kind of antibody that can be obtained by a procedure comprising a method as described above. Consequently, this invention includes, for example, monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, chimeric antibodies of human and immunized animals, 25 humanized antibodies, and human antibodies. For example, a transgenic mouse whose immune system has been substituted with that of a human is known in the art. Human antibodies can be obtained by immunizing such mice.

Preferable antibodies in the present invention are antibodies 30 that recognize human membrane proteins. Many membrane proteins are important as target molecules for drug discovery. However, antibodies specific to membrane proteins have been considered difficult to obtain due to purification difficulties. The present invention, however, has made it possible to efficiently obtain a 35 subject antibody, even though the target antigen is a recombinantly-produced membrane protein that co-exists with a

background antigen. For example, as a membrane protein, PepT1 is an important molecule. The nucleotide sequence and amino acid sequence of PepT1 are already known: human PepT1 (GenBank XM_007063) is described in J. Biol. Chem. 270(12) : 6456-6463 (1995); and mouse PepT1 (GenBank AF205540) is described in Biochim. Biophys. Acta. 1492: 145-154 (2000)).

Those anti-PepT1 antibodies that bind to an extracellular region of PepT1 are useful. In particular, an antibody that specifically binds to an extracellular region of PepT1 is preferable in the present invention. In the present invention, the phrase "specifically binds to an extracellular region" means the ability to immunologically discriminate extracellular regions of PepT1 from other regions. More specifically, an antibody that specifically binds to an extracellular region of PepT1 is defined as an antibody that binds to an extracellular region, but does not bind, for example, to an intracellular region or transmembrane domain of PepT1. Human PepT1 is a preferable PepT1 in the present invention. Human PepT1 includes not only PepT1s derived from humans, but also recombinant PepT1s obtained by expressing human PepT1 in a baculovirus expression system.

The human PepT1 molecules that are used as immunogens do not have to be entire molecules, as long as they retain a target antigen structure. For example, a fragment comprising a PepT1 extracellular region can be used as an immunogen. A preferable PepT1 in the present invention is a human PepT1 that comprises transport activity, or a full-length human PepT1. A full-length human PepT1 comprising transport activity is especially preferable. The transport activity of a human PepT1 can be detected by using the activity of incorporating a substrate into a cell as an indicator. As its substrates, PepT1 is known to incorporate glycylsarcosine or such into cells. Incorporation of glycylsarcosine can be assayed by using [¹⁴C] glycylsarcosine or such.

Human PepT1 is preferably expressed on the surface of a membrane (such as a viral envelope or cell membrane). The transport activity of a PepT1 expressed on the surface of a viral envelope can be detected by contacting a solution comprising viral particles with a substrate;

and then monitoring the incorporation of the substrate into the viral particles.

Well-known methods can be used for the methods of immunizing to obtain antibodies. Animals can be immunized with an immunogen using known methods. General methods include injecting a sensitizing antigen into a mammal by subcutaneous or intraperitoneal injection. Specifically, an immunogen is diluted with an appropriate volume of Phosphate-Buffered Saline (PBS) or physiological saline, and as desired, the suspension is mixed with an appropriate volume of a conventional adjuvant. This is emulsified and applied to the mammals. For example, Freund's complete adjuvant can be used as an adjuvant. In addition, after this, an immunogen that has been mixed with an appropriate volume of Freund's incomplete adjuvant is preferably applied several times every four to 21 days.

When immunizing an immunogen, an appropriate carrier can also be used. In this way immunization occurs, and the increased level of a desired antibody in the serum can be confirmed using conventional methods.

When obtaining the target antibodies, an increase in the level of a desired antibody in the serum is confirmed, and blood is then collected from the immunized mammals. Serum can be separated from collected blood using known methods. As polyclonal antibodies, serum comprising polyclonal antibodies can be used. Where necessary, fractions comprising polyclonal antibodies can be isolated from this serum, and this fraction can also be used.

For example, fractions only recognizing the target antigens can be obtained using affinity columns coupled to the target antigens. Immunoglobulin G or M can be prepared by purifying these fractions using a protein A or protein G column.

After confirming the increase in the level of the intended antibody in the serum of a mammal that was sensitized by the above-described antigen, the antibody-producing cells are extracted from the mammal and cloned to obtain monoclonal antibodies. Spleen cells and such can be used as antibody-producing cells. Antibody-producing cells can be cloned by cell fusion methods. Mammalian myeloma cells and such can be used as parent cells to be

fused with the above-mentioned antibody-producing cells. Even more preferably, myeloma cells that comprise unique auxotrophy or drug resistance can be examples of useful selective markers for fusion cells (hybridoma cells).

5 By basically following the methods known in the art, fusion cells can be obtained from the antibody-producing cells and the myeloma cells described above. Methods for producing monoclonal antibodies by using the cell fusion techniques have been established, for example, by Milstein et al. (Galfre, G. and Milstein, C., Methods 10 Enzymol. (1981) 73, 3-46).

The hybridoma cells produced by cell fusion techniques are selected by culturing in a selective medium. A suitable selective medium can be used in accordance with the characteristic features of the myeloma cells used for the cell fusion. HAT medium (a medium 15 comprising hypoxanthine, aminopterine, and thymidine), for example, can be used as a selective medium. The hybridoma cells are cultured in the HAT medium for a time sufficient to kill all cells other than the intended hybridoma cells (e.g. all non-fused cells). Generally, hybridoma cells can be selected by continuing culture for several 20 days to several weeks. After selection, a standard limiting dilution method can be used to screen and clone the hybridoma cells that produce the subject antibodies.

Subsequently, the hybridoma cells thus obtained are intraperitoneally transplanted into mice to obtain ascites fluid 25 comprising the monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies can also be purified from the ascites fluid. For example, monoclonal antibodies can be purified by ammonium sulfate precipitation methods, protein A or protein G columns, DEAE ion exchange chromatography, or affinity columns coupled with a target antigen.

30 In addition to producing antibodies by using hybridomas, antibody-producing cells such as antibody-producing sensitized lymphocytes and such, which have been immortalized using oncogenes or viruses and such, can also be used. Epstein-Barr virus (EBV) and so on can be used as a virus for immortalizing cells.

35 Monoclonal antibodies obtained in this way can also be used as recombinant antibodies that were produced using gene recombination

technologies (for example, see Borrebaeck, C.A.K. and Larrick, J.W., Therapeutic Monoclonal Antibodies, UK, Macmillan Publishers Ltd., 1990). Recombinant antibodies can be produced by cloning the DNAs that encode them from antibody-producing cells, such as hybridomas and antibody-producing sensitized lymphocytes, then incorporating these DNAs into a suitable vector, and introducing this vector into a host. The present invention also encompasses such recombinant antibodies.

The antibodies obtained by the methods of the present invention can also be antibody fragments, modified antibodies, and the like. For example, an antibody fragment can be an Fab, F(ab')₂, Fv, or a single chain Fv (scFv) where the Fvs of an H chain and L chain are linked by a suitable linker (Huston, J.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., (1998) 85, 5879-5883). Specifically, the antibody fragments can be obtained by treating antibodies with an enzyme such as papain or pepsin. Alternatively, genes encoding these antibody fragments are constructed, inserted into an expression vector, and expressed in appropriate host cells (see for example, Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137).

Antibodies bound to various molecules such as polyethylene glycols (PEG), can also be used as the modified antibodies. "Antibody" in the present invention also encompasses these modified antibodies. Such modified antibodies can be obtained by chemically modifying obtained antibodies. These methods have already been established in the art.

In addition, methods for obtaining human antibodies are known. A target antibody can be obtained by immunizing transgenic animals, that comprise the entire repertoire of human antibody genes, with a target antigen (see, International Patent Application No. WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, and WO 96/33735).

The antibodies obtained by the methods of the present invention can be chimeric antibodies comprising non-human antibody-derived variable regions, derived from the immunized animals, and human antibody-derived constant regions. In addition, they can also be 5 humanized antibodies comprising non-human antibody-derived complementarity determining regions (CDRs) which are derived from the immunized animals, human antibody-derived framework regions (FRs), and constant regions.

These modified antibodies can be produced using known methods. 10 Specifically, for example, a chimeric antibody is an antibody comprising the antibody heavy chain and light chain variable regions of an immunized animal, and the antibody heavy chain and light chain constant regions of a human. A chimeric antibody can be obtained by (1) ligating a DNA encoding a variable region of an immunized 15 animal-derived antibody to a DNA encoding a constant region of a human antibody; (2) incorporating this into an expression vector; and (3) introducing the vector into a host for production of the antibody.

A humanized antibody, which is also called a reshaped human antibody, is a modified antibody. A humanized antibody is 20 constructed by transplanting a complementarity determining region (CDR) of an antibody of an immunized animal, into the CDR of a human antibody. Conventional genetic recombination techniques for the preparation of such antibodies are known.

Specifically, a DNA sequence designed to ligate a mouse antibody 25 CDR with a human antibody framework region (FR) is synthesized by PCR, using several oligonucleotides constructed to comprise overlapping portions at their ends. A humanized antibody can be obtained by (1) ligating the resulting DNA to a DNA which encodes a human antibody constant region; (2) incorporating this into an 30 expression vector; and (3) transfecting the vector into a host to produce the antibody (see, European Patent Application No. EP 239,400, and International Patent Application No. WO 96/02576). Those human antibody FRs that are ligated via the CDR, such that the CDR forms a favorable antigen-binding site, are selected. As necessary, amino 35 acids in the framework region of an antibody variable region may be substituted such that the CDR of a reshaped human antibody forms an

appropriate antigen-binding site (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

Furthermore, genes coding for the antibodies can be isolated from the antibody-producing cells of an immunized animal. Methods used to isolate genes that code for antibodies are not limited. For example, genes coding for antibodies can be obtained by amplification using the PCR method, by using as templates those genes that code for variable regions, CDRs, or the like. Primers for the amplification of genes that code for antibodies are known in the art. Subject antibodies can be produced by expressing genes thus obtained in an appropriate expression system. Alternatively, the genes obtained by the present invention can be used to produce various modified antibodies, as described above.

Antibodies obtained as above can be purified until they are homogenous immunoglobulin molecules. These purification methods are not particularly limited. Separation and purification methods conventionally used for polypeptides can be used to separate and purify the antibodies used in the present invention. For example, immunoglobulins can be separated and purified by appropriately selecting and combining chromatography columns such as affinity chromatography columns, filters, ultrafiltration, salt precipitation, dialysis, SDS polyacrylamide gel electrophoresis, isoelectric focusing and so on (Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). The concentration of the above-obtained antibodies can be determined by measuring absorbance, or by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), etc.

Protein A columns, protein G columns, and such can be used as the columns for use in affinity chromatography. For example, Hyper D, POROS, Sepharose F.F. (Pharmacia) and so on are examples of the columns using protein A.

Examples of chromatography other than affinity chromatography include ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, gel filtration, reverse chromatography, and adsorption chromatography (Strategies for Protein Purification and Characterisation: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R, Marshak et al., Cold Spring

Harbor Laboratory Press, 1996). These chromatographies can be carried out using liquid phase chromatography such as HPLC and FPLC.

Brief Description of the Drawings

5 Figs. 1 and 2 show the nucleotide sequence of the constructed gp64 gene.

Fig. 3 shows the structure of the pCAG-gp64 vector constructed in Examples.

Fig. 4 is a photograph of the Founder mice testes.

10 Fig. 5 is a photograph showing the result of mRNA expression analysis by Northern blotting. In this figure, H, B, I, and M refer to heart, brain, intestine, and muscle, respectively.

15 Fig. 6 is a photograph showing the results of Western blotting analysis using anti-mouse IgG. In this figure, "pre" and "2nd" respectively refer to pre-immunization blood collection, and blood collection after the second immunization. Gp64TgM and wtBALB/c represent transgenic and non-transgenic mice, respectively.

20 Fig. 7 is a photograph showing the results of Western blotting analysis using anti-mouse IgG. Gp64TgM and wtBALB/c represent transgenic and non-transgenic mice, respectively.

Fig. 8 shows the result of FACS analysis of the antibody titer for PepT1-specific antibody in the mouse serum. In this figure, the x-axis and y-axis respectively represent cell number (log scale) and fluorescence intensity. (Above) mouse #1; (below) mouse #2.

25 Fig. 9 shows the results of the same analysis in Fig. 8. (Above) mouse #3; (below) no antibody.

Best Mode for Carrying out the Invention

The present invention is specifically described herein below 30 using Examples, however, it is not to be construed as being limited thereto.

[Example 1] Construction of gp64 transgenic vector

35 The nucleotide sequence of gp64 and the amino acid sequence encoded by the gp64 gene are shown in SEQ ID NOS: 3 and 4, respectively (GenBank Acc No. 9627742). PCR was carried out using the gp64 gene

as a template, and using the following primer set: the 5' primer 64F1 (SEQ ID NO: 1), which comprises an EcoRI recognition sequence and the KOZAK sequence at its 5' terminus; and the 3' primer 64R1 (SEQ ID NO: 2), which comprises an EcoRI recognition sequence at its 5' terminus (Figs. 1 and 2). The PCR conditions are shown below:

The PCR reaction solution composition was 5 µl of x10 ExTaq buffer, 4 µl of dNTP supplied with ExTaq, 1 µl of 10 µmol/l 64F1 primer, 1µl of 10 µmol/l 64R1 primer, 1µl of 500 pg/µl pBac-N-blue, 0.5 µl of 5 units/µl ExTaq, and 37.5 µl of DIW. PCR was carried out for:
5 minutes at 94°C;
10 cycles of "15 seconds at 94°C, 30 seconds at 57°C, and 30 seconds at 72°C";
7 minutes at 72°C; and
4°C forever.

The amplified band was subcloned into pGEM-Teasy, and then transformed *E. coli* DH5α cells. After performing colony PCR using T7 and SP6 primers, the nucleotide sequence of clones confirmed to comprise the insert was analyzed with the ABI Prism377 DNA sequencer and the BigDye Cycle Sequence kit, in combination with the T7 primer or the SP6 primer. As a result, clones comprising the subject gene were confirmed. A fragment comprising the gp64 gene and confirmed to comprise no mutations in its nucleotide sequence was isolated from the clones by EcoRI digestion, and then inserted into an EcoRI-digested pCAGGS1. The resulting vector was used to transform *E. coli* DH5α cells. Cells comprising the clone as designed were incubated in 250 ml of LB medium at 37°C overnight, and purified by using the Endofree MAXI kit to obtain 581.6 µg of plasmid.

[Example 2] Introduction of the gene

The DNA fragment for injection was prepared as follows: The pCAGGS vector into which the gp64 gene was inserted (pCAG-gp64, Fig. 3) was treated with SalI and PstI to yield a fragment (about 3.8 kb) comprising the gp64 gene. This fragment (about 3.8 kb) was extracted using the Gel Extraction kit (QIAGEN), and then diluted with PBS to a concentration of 3 ng/µl, yielding the DNA fragment for injection.

The mouse pronuclear eggs to be injected with the DNA fragment

were collected as follows: Specifically, BALB/c series female mice (Nippon CLEA) were induced to superovulate by intraperitoneal administration of 5 international units (i.u) of PMSG, followed by intraperitoneal administration of 5 i.u of hCG 48 hours later. These 5 female mice were mated with male mice of the same lineage. The morning after mating, the oviducts of female mice that were confirmed to have a vaginal plug were perfused to recover pronuclear eggs.

The DNA fragments were injected into the pronuclear eggs with a micromanipulator (The latest technologies in gene targeting (gene targeting no saishin gijyutu) (Yodosha), 190-207, 2000). The DNA 10 fragments were injected into 373 embryos of BALB/c mice. On the next day, 216 embryos that had developed to the two-cell stage were transplanted into the oviducts of recipient female mice, which were in the first day of pseudopregnancy, at a density of around ten embryos 15 per oviduct (i.e. around 20 embryos per mouse).

The recipient female mice that did not give birth to offspring by the expected date of delivery were subjected to caesareans, and the resultant offspring were brought up by a foster parent. The results are summarized in Table 1. Fifty offspring were obtained, 20 four of which were transgenic mice into which the gp64 gene has been introduced (referred to as Tgm below). Hereinafter, the transgenic mice obtained in the first generation are described as "Founder" mice.

Table 1

	Viable embryos after injection/ Embryos receiving injection	Transplanted embryos	Implanted embryos	Offspring (female, male)	Weaned Offspring (female, male)	Founder
1st	59/63	55	20	9 (4, 5)	9 (4, 5)	0
2nd	186/223	161	57	26 (13, 13)	25 (13, 12)	Male 3
3rd	61/87	56	35	15 (9, 6)	15 (9, 6)	Male 1
Total	306/373	216	107	50 (25, 25)	49 (25, 24)	Male 4

25

All of the four Founder mice were male. Two lines (Nos. 30 and 31) of these four resulted in four and 20 offspring (F1 mice),

respectively. The F1 mice thus obtained were genotyped, and three offspring in line 30 were found to be Tgm, indicating inheritance of the gp64 gene to the second generation. On the other hand, in line 31, all 20 offspring were found to be wild type mice (non-Tgm), in which the gp64 gene could not be detected. Accordingly, the gp64 gene was considered to be integrated into the line 31 Founder mouse in a mosaic structure. Founder mice of lines 34 and 46 had no fertility properties, and therefore, offspring were not obtained. Although the Founder mouse of line 30 impregnated one recipient female immediately after the initiation of crossing, no further offspring was obtained after that (Table 2).

Table 2

Line No.	Date of birth	Sex	Copy Number of the introduced gene	Offspring obtained (date of birth, total offspring, and Tg)			Notes
30	010709	Male	More than 10 copies	010926	Female 3, Male 1	Female 3	No offspring were obtained after the first delivery. Testes are small and sperm are not observed.
31	010709	Male	2 to 3 copies	010927	Female 3, Male 5	0	Mosaic for gene transfer
				011022	Male 2	0	
				011108	Female 4, Male 6	0	
34	010709	Male	2 to 3 copies	No fertility properties	-	-	Testes are small and sperm are not observed.
46	010821	Male	2 to 3 copies	No fertility properties	-	-	Testes are small and sperm are not observed.

Consequently, sperm from the Founder mice of lines 30, 34, and 46 was extracted in order to carry out *in vitro* fertilization. The testes of all three Founder mice were abnormally small (Fig. 4), and no sperm was observed in their cauda epididymidis. Thus *in vitro* fertilization could not be achieved. From these results, the gp64 protein was found to affect the spermatogenic ability of mice. Therefore, it may be possible to use gp64 in contraception and such.

[Example 3] Confirmation of the introduced gene

DNA was extracted from tails of three week-old mice using an automated nucleic acid isolation system (KURABO), and the presence of the introduced gene was confirmed by Southern blotting method and 5 PCR. The introduced gene was confirmed by Southern blotting, as follows: First, 15 µg of genome DNA was digested with EcoRI, subjected to electrophoresis, and transferred to a nylon membrane. Then, the presence of the introduced gene was confirmed by hybridizing the transferred DNA with a probe, which was about 1.5 kb of EcoRI-digested 10 fragment of pCAG-gp64 vector that comprises the gp64 gene. The presence of the introduced gene was also confirmed by the PCR method, using about 100 ng of DNA as a template, and primers comprising the sequences as shown below:

Sense primer 64F1: GAATTCCACCATGGTAAGCGCTATTGTT (SEQ ID NO: 1); and 15 Antisense primer 64R1: GAATTCTTAATATTGTCTATTACGGT (SEQ ID NO: 2).

PCR was carried out for:

5 minutes at 94°C;
35 cycles of "15 seconds at 94°C, 30 seconds at 57°C, and 30 seconds at 20 72°C";
7 minutes at 72°C; and
4°C forever.

The PCR products thus obtained were subjected to electrophoresis to confirm the introduced gene using the presence or absence of a band corresponding to about 1.5 kb as an indicator.

25

[Example 4] Confirmation of the expression of the gp64 gene in gp64 Tgm

In the line 30 Founder mouse in which inheritance of the gp64 gene to the second generation had been confirmed, expression of the 30 gp64 gene was confirmed by Northern blotting analysis. Specifically, total RNA was extracted from four kinds of organ, heart, brain, intestine, and a thigh muscle, by using ISOGEN (Nippon Gene). Then, 20 µg of the total RNA was subjected to electrophoresis, and was transferred to a nylon membrane. An about 1.5 kb of EcoRI-digested 35 fragment of pCAG-gp64 vector that comprises the gp64 gene was used as the probe for the Northern blotting analysis. An around 1.5 kb

band corresponding to the gp64 gene was expected from the vector construct.

Fig. 5 shows these results. Expression of the gp64 gene was confirmed at least in heart, brain, and thigh muscle. The reason why 5 the bands were seen as three bands is unknown.

[Example 5] Fertility properties of the line 30 female Tgm (crossing of mice)

When the line 30 female Tgm turned eight weeks-old, they were 10 crossed with a male mouse of the same lineage.

As a result, a total of 31 (14 females and 17 males) offspring (F2) were obtained from two deliveries by each of the three F1 female mice (Table 3). 14 of these offspring (five females and nine males) were Tgm. Since offspring were also obtained from the third delivery, 15 the female Tgm were shown to have normal fertility properties.

Table 3

Sex	Individual Number	Number of Deliveries	Offspring (Non-Tg)	Offspring (Tg)
Female	1	2	Female 3, Male 1	Female 1, Male 6
Female	2	2	Female 4, Male 3	Female 2, Male 1
Female	3	2	Female 2, Male 4	Female 2, Male 2

[Example 6] Preparation of budding baculoviruses expressing PepT1
20 Budding baculoviruses expressing PepT1 and used as immunogens were prepared as follows: PepT1 is a membrane protein that acts as a transporter. The PepT1 structure is known in the art (GenBank XM_007063, J. Biol. Chem. 270(12): 6456-6463 (1995)).

A full-length PepT1 gene was isolated from a human kidney 25 library using PCR. By inserting the full-length human PepT1 gene into pBlueBacHis2A (Invitrogen), the pBlueBacHis-PepT1 transfer vector was constructed. A Bac-N-Blue transfection kit (Invitrogen) was then used to introduce this transfer vector into Sf9 cells, along with

Bac-N-Blue DNA. Thus, a recombinant virus for the expression of human PepT1 was constructed. Specifically, 4 µg of pBlueBacHis-PepT1 was added to Bac-N-Blue DNA, and then 1 mL of Grace's medium (GIBCO) and 20 µL of cell FECTIN reagent was added. This was mixed, incubated 5 for 15 minutes at room temperature, and then added drop-by-drop to 2x 10⁶ Sf9 cells washed once with Grace's medium. After incubating for four hours at room temperature, 2 mL of complete medium (Grace's medium which comprises 10% fetal bovine serum (Sigma), 100 units/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (GIBCO-BRL)) was added and 10 cultured at 27°C. Recombinant viruses for expressing human PepT1, which were constructed by homologous recombination, were cloned twice according to the instructions attached to the kit. A virus stock of the recombinant viruses was thus obtained.

Construction of budding-type viruses that express human PepT1 was carried out as follows: Specifically, 500 mL of Sf9 cells (2x 15 10⁶/mL) were infected with the recombinant viruses prepared as above, so as to achieve MOI= 5. After culturing at 27°C for three days, the culture supernatant was centrifuged for 15 minutes at 800x g, and the cells and cell debris were removed. The supernatant recovered 20 by centrifugation was centrifuged at 45,000x g for 30 minutes, and the precipitate was then suspended in PBS. The cellular components were removed by centrifuging for another 15 minutes at 800x g. The supernatant was again centrifuged at 45,000x g for 30 minutes, and the precipitate was again suspended in PBS. This suspension was the 25 budding virus fraction. Expression of PepT1 in the virus and on the Sf-9 cell membrane was confirmed by Western analysis using anti-His antibodies. In addition, protein concentration was measured using Dc Protein Assay kit (Bio-Rad), with BSA as the standard.

30 [Example 7] Immunization of mice

Mice were immunized by subcutaneous injection with an immunogen, which was emulsified according to the standard method using complete and incomplete Freund's adjuvants (Difco). Injection doses in the first and the second immunizations were 1 mg/mouse and 0.5 mg/mouse, 35 respectively. The second immunization was given 14 days after the first immunization. Seventeen days after the first immunization,

serum samples were taken from the mice by retro-orbital bleeding.

[Example 8] Confirmation of immunotolerance to gp64 by Western blotting analysis

5 PepT1-BV (1 µg/lane) was subjected to SDS-PAGE analysis on 12% gel under reducing conditions. After the electrophoresis, proteins were electroblotted onto a PVDF membrane. This membrane was reacted with 1,000 fold-diluted serum samples, sequentially washed, and then reacted with a 1,000 fold-diluted Biotin-Anti-Mouse IgG(γ) (Zymed)
10 and Streptavidin-Alkaline Phosphatase (Zymed). An alkaline phosphatase staining kit (Nakarai) was used for staining. A positive control antibody for detecting gp64 was purchased from NOVAGEN.

Fig. 6 shows the results. When stained with the Anti-Mouse IgG, a band corresponding to the gp64 protein was strongly stained for
15 the lanes reacted with both of the two serum samples obtained from non-transgenic mice. On the other hand, though gp64 was detected in all three gp64 transgenic mice, staining was weak. These results indicate that the amount of anti-gp64 antibody produced by the transgenic mice is considerably less than that produced by
20 non-transgenic mice. Although the Anti-Mouse IgM staining was weak for the two non-transgenic mice, it was very weak or not stained at all in the gp64 transgenic mice (Fig. 7).

[Example 8] Production of anti-PepT1 antibodies by gp64 Tgm
25 Following procedures were used for the initial immunization. 200 µl PBS comprising 1 mg of PepT1-BV and 100 ng of pertussis toxin was subcutaneously injected into Tgm. For the second and subsequent immunizations, 0.5 mg of PepT1-BV suspension in PBS was subcutaneously injected.

30 Ba/F3 cells expressing PepT1 on the cell surface (herein after, referred to as Ba/F3-PepT1) and Ba/F3 cells expressing no PepT1 were washed twice with PBS, respectively. 100 µl of mouse serum sample that was 220 fold-diluted with PBS was added to 1x 10⁶ cells of each cell type, followed by reaction for 30 minutes on ice. After reaction,
35 cells were washed once with 500 µl PBS and 100 µl of FITC-anti-mouse IgG 200 fold-diluted with PBS was added. This was allowed to react

for 30 minutes on ice. After centrifugation, cells were suspended in 500 µl of PBS and analyzed by FACS. Figs. 8 and 9 show the results of FACS analysis of a serum obtained from a mouse after the fifth immunization. In these figures, solid lines and dotted lines 5 indicate Ba/F3 and Ba/F3-PepT1 cells, respectively.

From these results, the titer of antibody reacting specifically with Pep-T1 was confirmed to be increased in the serum of mice immunized with PepT1-BV.

10 Industrial Applicability

This invention enables efficient production of antibodies against target antigens, using target antigens that comprise background antigens. The antibody-production methods of the present invention are useful in producing antibodies by using immunogens in 15 which contamination by background antigens is inevitable.

For example, an exogenous gene expression system, known as the baculovirus expression system, is useful as a tool for obtaining recombinant proteins easily and in large quantities. In particular, when applied to membrane proteins, the baculovirus expression system 20 is excellent in that the membrane proteins are obtainable with other viral envelope proteins in a state that maintains their structure. However, this expression system is also problematic in that, when using this expression product as the immunogen, gp64 acts as a background protein and interferes with the acquisition of antibodies 25 against a target protein.

By using the antibody-production methods of the present invention, it is possible to efficiently suppress the adverse effect of background antigens on the proteins prepared by the baculovirus expression system. As a result, anti-membrane protein antibodies can 30 be produced efficiently by using the membrane protein antigens, which can be obtained in large quantities using the baculovirus expression system, as target antigens.

Membrane proteins include many functionally important proteins such as receptors and cell adhesive proteins. Therefore, antibodies 35 that recognize membrane proteins are expected to play an important role in functional analysis, localization analysis, quantification,

diagnosis, or the development of therapeutic agents that regulate membrane protein activities.

Preparation of membrane proteins applicable as immunogens has been thought to be difficult. However, by the present invention, 5 large quantities of membrane proteins produced by, for example, the baculovirus expression system, can be used as immunogens without removing background antigens. Consequently, many antibodies that recognize various membrane proteins and that have been considered to be difficult to produce can now obtained very efficiently.

10 The antibody-production methods of the present invention contribute to the functional analysis of membrane proteins and diagnosis using antibodies, and to the development of drugs based on the regulation of membrane protein activities.

15 All prior art documents cited in the present application are hereby incorporated by reference in their entirety.

CLAIMS

1. A method for producing an antibody that recognizes a target antigen, wherein the method comprises the steps of:

- 5 i) immunizing a non-human animal that has immunotolerance to a background antigen comprised in an immunogen, wherein the immunogen comprises both the target antigen and the background antigen; and ii) obtaining an antibody against the target antigen, or a gene encoding the antibody.

10

2. The method of claim 1, wherein immunotolerance is induced artificially.

15 3. The method of claim 1, wherein the non-human animal is a transgenic non-human animal.

4. A method for producing an antibody against a target antigen, wherein the method comprises the steps of:

- 20 (a) preparing an immunogen comprising the target antigen and a background antigen;
- (b) producing a transgenic non-human animal comprising a gene expressibly encoding the background antigen;
- (c) administering the immunogen of (a) to the transgenic non-human animal of (b); and
- 25 (d) isolating the antibody against the target antigen from the transgenic non-human animal.

5. The method of claim 4, wherein the immunogen is a virus particle or a part thereof.

30

6. The method of claim 5, wherein the virus is a baculovirus.

7. The method of claim 4, wherein the target antigen is a membrane protein.

35

8. The method of claim 6, wherein the background antigen is gp64.

9. The method of claim 4, wherein the non-human animal is a mouse.
10. An antibody that is produced by the method of any one of claims
5 1 to 9.
11. A chimeric antibody between a non-human animal and human, or a
humanized antibody, produced using the antibody of claim 10.
- 10 12. A transgenic non-human animal, into which a gene encoding a viral
envelope protein is introduced.
13. The transgenic non-human animal of claim 12, wherein the virus
is a baculovirus.
- 15 14. The non-human animal of claim 13, wherein the viral envelope
protein is gp64.
- 15 15. The non-human animal of claim 12, wherein the non-human animal
20 is a mouse.
16. The non-human animal of claim 12, for use in producing an antibody
against an antigen comprising a viral protein.
- 25 17. A method for producing a non-human immunized animal, wherein the
method comprises the step of producing a transgenic non-human animal
into which a gene encoding a background antigen is introduced.
- 30 18. A non-human immunized animal for obtaining an antibody against
a target antigen comprising a background antigen, wherein the animal
is produced by the method of claim 17.
19. A method for producing an antibody against PepT1, wherein the
method comprises the steps of:
- 35 (a) preparing a baculovirus that expressibly comprises a DNA which
encodes PepT1 or a fragment thereof;

- (b) infecting a host cell with the baculovirus of (a) to obtain a budding virus that expresses PepT1 or a fragment thereof;
- (c) producing a transgenic non-human animal that expressibly comprises a gene encoding a baculovirus membrane protein gp64;
- 5 (d) immunizing the transgenic non-human animal of (c) with a fraction comprising the budding virus of (b) or PepT1 or its fragment; and
- (e) recovering the antibody-recognizing PepT1 from the immunized animal.

ABSTRACT

This invention provides methods for producing antibodies, wherein the methods comprise the step of administering an immunogen comprising both a target antigen and a background antigen to transgenic animals, into which a gene coding for the background antigen has been introduced. Since immunotolerance to the background antigens have thus been induced in the transgenic animals, the animals efficiently produce antibodies to target antigens.